

**Struktur und Pathogen-abhängige Aktivierung von Faktoren
des Toll-*like*-Rezeptor (TLR) -vermittelten Signalweges bei
Salmoniden**



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
***doctor rerum naturalium* (Dr. rer. Nat.)**
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Andreas Brietzke, geb. am 06.11.1980 in Crivitz
aus Rostock

Rostock Juni 2015

Datum der Einreichung:

12.06.2015

Tag der Promotionsverteidigung:

25.01.2016

Gutachter:

Prof. Dr. Hans-Martin Seyfert

Institut für Genombiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Prof. Dr. Renate Horn

Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzengenetik, Universität Rostock

I Abbildungsverzeichnis	IV
II Tabellenverzeichnis.....	V
III Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem der Fische	3
1.2 Die Aktivierung der Immunantwort	5
1.3 Die Rekrutierung der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade.....	9
1.4 Die Rolle der Zytokine	10
1.5 Zielsetzung.....	11
 2. Material und Methoden.....	 12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Versuchstiere	12
2.1.2 Enzyme, Chemikalien, Reagenziensätze, Oligonukleotide	12
2.1.3 Infektionsversuch.....	13
2.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren.....	14
2.2.1 Isolation von RNA aus Geweben.....	14
2.2.2 Isolation von DNA aus Geweben	15
2.2.3 <i>Primerdesign</i>	15
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.2.4.1 Standard-PCR	17
2.2.4.2 <i>Long-Template-PCR</i>	17
2.2.4.3 <i>Touch-down-PCR</i>	18
2.2.4.4 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)	19
2.2.4.5 <i>3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE)</i>	19
2.2.4.6 <i>5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE)</i>	20
2.2.4.7 <i>Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR)</i>	21
2.2.5 Isolation von genomischen Sequenzen mit Hilfe der <i>Genome Walker</i> Methode	23
2.2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	25
2.2.8 Klonierung	25
2.2.8.1 Klonierung in <i>pGEM-T Easy Vector System I</i>	26
2.2.8.2 Einfügen von Restriktionsenzym-Bindestellen	28
2.2.8.3 Expressionsklonierung	29
2.2.9 DNA-Sequenzierung.....	31
2.3 Zellkultur und Analysen von exprimierten Faktoren.....	31
2.3.1 Zellkultur der Zelllinie HEK293.....	31
2.3.2 Transfektion mit <i>Lipofectamine 2000</i>	32
2.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	32

2.3.4 SDS-PAGE	33
2.3.5 Western Blot	33
2.3.6 Reportergenanalyse.....	34
2.3.7 Durchflusszytometrie.....	35
2.4 <i>In silico</i> Methoden	36
2.3.1 <i>Software</i> , Datenbanken, <i>Online-tools</i>	36
2.3.2 Erstellen von Stammbäumen mit Programm MEGA 5	36
2.3.3 Statistik und graphisches Darstellung.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Strukturelle und funktionale Charakterisierung von Schlüsselfaktoren der TLR-Signalkaskade	38
3.1.1 Der TLR2-Faktor der Regenbogenforelle.....	38
3.1.1.1 TLR2-cDNA-Sequenz der Forelle.....	38
3.1.1.2 <i>TLR2</i> -Gen der Forelle	42
3.1.1.3 Funktionale Gliederung des TLR2a-Faktors der Regenbogenforelle.....	44
3.1.1.4 Konservierungsgrad entscheidender Aminosäurereste	46
3.1.1.5 Phylogenetischer Vergleich der TLR2-Aminosäuresequenzen	48
3.1.1.6 Gewebe-spezifische Expression des <i>TLR2</i> der Forelle.....	49
3.1.1.7 Funktionale Analysen zum Forellen-TLR2 im HEK293 Zellmodell	51
3.1.2 Der IRAK4-Faktor der Salmoniden.....	54
3.1.2.1 IRAK4-cDNA der Salmoniden.....	55
3.1.2.2 <i>IRAK4</i> -Gen der Salmoniden	57
3.1.2.3 Funktionale Gliederung des IRAK4-Faktors der Salmoniden.....	59
3.1.2.4 Phylogenetischer Vergleich der IRAK-Aminosäuresequenzen.....	61
3.1.2.5 Gewebe-spezifische Expression des <i>IRAK4</i> und <i>IRAK4s</i> der Regenbogenforelle	63
3.1.2.6 Funktionale Analysen zum Forellen-IRAK4 im HEK293 Zellmodell.....	63
3.2 Expressionsmodulationen von Faktoren des angeborenen Immunsystems im Verlaufe einer Infektion mit <i>A. salmonicida</i>	66
3.2.1 Validierung der Infektion.....	66
3.2.1.1 Aktivierung von Zytokinen.....	66
3.2.1.2 Migration von Leukozyten im Intraperitoneum.....	67
3.2.1.3 Expression des T-Zell-Rezeptors (TRB) und Immunglobulin M (IgM)	69
3.2.2 Expression der TLRs	70
3.2.2.1 Vergleich der Infektionsabhängigen Expression der TLR2-Varianten	70
3.2.2.2 Gewebe-spezifische Expression der PRRs der Regenbogenforelle.....	71
3.2.2.3 Infektionsabhängige Expression der PRRs der Regenbogenforelle	72
3.2.3 Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade.....	74

3.2.3.1 Gewebe-spezifische Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade	74
3.2.3.2 Infektionsabhängige Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade	75
4. Diskussion	77
4.1 Struktur und Funktion der Schlüsselfaktoren	77
4.1.1 Der TLR2 der Regenbogenforelle wird wenigstens von einem monoexonischen und einem polyexonischen Gen kodiert.....	77
4.1.2 Das <i>TLR2a</i> der Regenbogenforelle kodiert ein funktionales Transkript	79
4.1.3 Die <i>IRAK4</i> -Genstruktur der Salmoniden ist konserviert	84
4.1.4 Die <i>Salmoniden</i> kodieren ein funktionales IRAK4-Transkript	85
4.2 Expressionsmodulationen der Immunsystem-Faktoren im Verlaufe eine Infektion mit <i>A. salmonicida</i>	89
4.2.1 Die schwere Infektion mit <i>A. salmonicida</i> führte zur starken Induktion von Zytokinen	90
4.2.2 Die Infektion löste eine Rekrutierung von überwiegend myeloiden Zellen in das Intraperitoneum aus	91
4.2.3 T- und B-Zell-Migration erfolgte erst 12 h pI in der Kopfniere	92
4.2.4 Die Expression der Toll-like-Rezeptoren	93
4.2.5 Die Expression der nachgeschalteten Faktoren	95
5. Ausblick.....	98
6. Zusammenfassung.....	98
A Danksagung.....	i
B Literaturverzeichnis	ii
C Anhang 1 - Veröffentlichungen.....	xvi
C1 Publikationen in wissenschaftlichen Journalen.....	xvi
C2 Konferenzen & Workshops.....	xvii
D Anhang 2 - Methoden.....	xviii
E Anhang 3 - Ergebnisse.....	xxxi
F Lebenslauf.....	xliv
G Selbständigkeitserklärung.....	xlv

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung der Fischproduktion von 1950 bis 2011
Abbildung 2:	Lokalisation der Faktoren der TLR-Signalkaskade in der Regenbogenforelle
Abbildung 3:	Prinzip der 3'- <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
Abbildung 4:	Prinzip der 5'- <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der <i>Genome Walker</i> TM -Methode
Abbildung 6:	Beispiel für einen Restriktionsverdau
Abbildung 7:	Ableitung der degenerierten <i>Primer</i> für das erste Forellen-TLR2-Fragment
Abbildung 8:	Elektrophoretische Darstellung der ersten TLR2-cDNA-Fragmente
Abbildung 9:	<i>Alignment</i> der 3'RACE -Sequenzen
Abbildung 10:	Genstruktur der TLR2-Gene
Abbildung 11:	Funktionale Gliederung und 3D-Modell des TLR2-Faktors der Regenbogenforelle
Abbildung 12:	<i>Alignment</i> der TLR2 Aminosäuresequenzen von Regenbogenforelle und Mensch
Abbildung 13:	Phylogenetischer Vergleich der TLR2-Aminosäuresequenzen
Abbildung 14:	Gewebe-spezifische Expression des <i>TLR2</i> und der <i>TLR2</i> -Varianten
Abbildung 15:	Nachweis der Expression des TLR2-GFP-Konstruktes
Abbildung 16:	Liganden-spezifische Aktivierung des TLR2
Abbildung 17:	Keine Aktivierung des TLR2 durch <i>A. salmonicida</i>
Abbildung 18:	<i>IRAK4</i> -Gene der Salmoniden im Vergleich
Abbildung 19:	Phylogenetischer Vergleich der <i>IRAK4</i> -Gene der Salmoniden
Abbildung 20:	Phylogenetischer Vergleich der <i>IRAK</i> -Aminosäuresequenzen
Abbildung 21:	Gewebe-spezifische Expression von <i>IRAK4</i> und <i>IRAK4s</i> der Regenbogenforelle
Abbildung 22:	Nachweis der Expression des <i>IRAK4</i> -GFP-Konstruktes
Abbildung 23:	Expression der <i>IRAK4</i> -Expressionsplasmide
Abbildung 24:	Infektionsabhängige Zytokinexpression in der Milz
Abbildung 25:	Infektionsabhängige Migration von Leukozyten
Abbildung 26:	Infektionsabhängige Expression von <i>TRB</i> und <i>IgM</i>
Abbildung 27:	Gewebe-spezifische Expression der <i>TLRs</i> und von <i>NOD1</i>
Abbildung 28:	Infektionsabhängige Veränderung der mRNA-Konzentrationen der <i>TLRs</i>
Abbildung 29:	Gewebe-spezifische Expression der nachgeschalteten Faktoren
Abbildung 30:	Infektionsabhängige Modulation der mRNA-Konzentrationen der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die TLRs der Säuger und ihre Liganden
Tabelle 2:	Verzeichnis der verwendeten Enzyme
Tabelle 3:	Aufreinigungsschritte der RNA-Präparation
Tabelle 4:	Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA
Tabelle 5:	Pipettierschema für eine Standard-PCR
Tabelle 6:	Standard-PCR-Programm
Tabelle 7:	Pipettierschema für eine <i>Long-Template</i> -PCR
Tabelle 8:	<i>Long-Template</i> -PCR-Programm
Tabelle 9:	<i>Touch-down</i> -PCR-Programm
Tabelle 10:	Pipettierschema für eine RT-PCR
Tabelle 11:	Durchführung des 5'-RACE-Experiments
Tabelle 12:	Pipettierschema für die RT-qPCR
Tabelle 13:	RT-qPCR- Programm
Tabelle 14:	Ablauf der <i>Genome Walker</i> TM -Methode
Tabelle 15:	Herstellung des Formaldehyd-Agarosegels
Tabelle 16:	Behandlung der RNA-Proben
Tabelle 17:	Durchführung der Ligation mit dem pGEM®-T <i>Easy Vector System I</i>
Tabelle 18:	Durchführung der Transformation mit dem pGEM®-T <i>Easy Vector System I</i>
Tabelle 19:	Durchführung der Plasmidrestriktion für die Kontrolle der Klone
Tabelle 20:	Durchführung der Plasmidpräparationen
Tabelle 21:	Durchführung der Plasmidrestriktion für Expressionsklonierung
Tabelle 22:	Durchführung der Ligation bei der Expressionsklonierung
Tabelle 23:	Durchführung der endotoxinfreien Plasmidpräparationen
Tabelle 24:	Durchführung der Transfektion mit <i>Lipofectamine 2000</i>
Tabelle 25:	Durchführung des Western Blot
Tabelle 26:	Durchführung des Luciferase Nachweis
Tabelle 27:	Verzeichnis der <i>Software</i> , Datenbanken, <i>Onlinetools</i>
Tabelle 28:	Identitätenvergleich im Verhältnis zum Forellen-TLR2 in %
Tabelle 29:	ct-Werte der Standards von TLR2 (LRR), TLR2a und TLR2b TVX1
Tabelle 30:	Übersicht über die ermittelten IRAK4-Sequenzen
Tabelle 31:	Sequenzidentitäten des IRAK4-Gens der Salmoniden
Tabelle 32:	Sequenzidentitäten gegenüber dem Forellen-IRAK4
Tabelle 33:	Infektionsabhängige Expression der <i>TLR2</i> -Varianten

III Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Genbezeichnungen sind dem Vorschlag des HUGO *Gene Nomenclature Committee* entlehnt.

ANOVA	<i><u>a</u>nalysis of <u>v</u>ariance</i>
BCIP	5- <u>B</u> rom-4- <u>c</u> hlor-3- <u>i</u> ndolylphosphat
BLAST	<i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
CD	<i><u>C</u>luster of <u>d</u>ifferentiation</i>
DAMP	<i><u>d</u>amage-<u>a</u>ssociated <u>m</u>olecular <u>p</u>attern</i>
DNA	<i><u>D</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
CASO	<i><u>C</u>asein-peptone <u>S</u>oymeal-peptone</i>
CIP	<i><u>C</u>alf <u>I</u>ntestine <u>P</u>hosphatase</i>
CLCs	C-type lectin receptors
ELAM	<i><u>e</u>ndothelial-<u>l</u>eukocyte <u>a</u>dhesion <u>m</u>olecule</i>
FAO	<i><u>F</u>ood and <u>A</u>griculture <u>O</u>rganization of the United Nations</i>
FACS	<i><u>f</u>luorescence-<u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>s</u>orting</i>
FITC	<i><u>F</u>luorescein<u>i</u>sothiocy<u>a</u>nat</i>
FKS	<i><u>F</u>ötales <u>K</u>älberserum</i>
GFP	<i><u>G</u>rün <u>f</u>luoreszierendes <u>P</u>rotein</i>
HEK	<i><u>h</u>uman <u>e</u>mbryonic <u>k</u>idney</i>
HeLa-Zellen	<i><u>H</u>enriette <u>L</u>acks (menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebs)</i>
IFN	Interferon
IgM	<i><u>I</u>mmunglobulin <u>M</u></i>
IL	<i><u>I</u>nter<u>l</u>eukin</i>
IL1R1	<i><u>I</u>nter<u>l</u>eukin-1-<u>R</u>ezeptor Typ 1</i>
IPTG	<i><u>I</u>sopropyl-β-D-<u>t</u>hiogalactopyranosid</i>
IRF	<i><u>I</u>nterferon <u>r</u>egulatory <u>f</u>actor</i>
IRAK	<i><u>I</u>nterleukin-1 <u>R</u>ezeptor-assozierte <u>K</u>inase</i>
LB	<i><u>l</u>ysogeny <u>b</u>roth</i>
LPS	<i><u>L</u>ipopolysaccharid</i>
LRR	<i><u>l</u>eucine-<u>r</u>ich <u>r</u>ep<u>e</u>at</i>
LTBPs	<i>latency-associated proteins and latent TGFbeta binding proteins</i>
MAPK	<i><u>M</u>itogen<u>a</u>ktivier<u>e</u>te <u>P</u>rotei<u>n</u>ki<u>n</u>ase</i>

MARCH5	<i><u>m</u>embrane-<u>a</u>ssociated <u>R</u>ING-<u>C</u>H</i>
MYD88	<i><u>m</u>yeloid <u>d</u>ifferentiation <u>p</u>rimary <u>r</u>esponse 88</i>
NBT	<i><u>N</u>itro<u>b</u>lau-<u>T</u>etrazoliumchlorid</i>
NF-κB	<i><u>n</u>uclear <u>f</u>actor <u>k</u>appa-B</i>
NEAA	<i><u>N</u>on-<u>E</u>ssential <u>A</u>mino <u>A</u>cids</i>
NLRs	<i><u>N</u>OD-<u>l</u>ike <u>r</u>eceptors</i>
NOD1	<i><u>n</u>ucleotide-binding <u>o</u>ligomerization <u>d</u>omain containing 1</i>
OLR	<i><u>O</u>ffener <u>L</u>eser<u>a</u>hmen</i>
PAMP	<i><u>p</u>athogen-<u>a</u>ssociated <u>m</u>olecular <u>p</u>attern</i>
PGRP-SC	<i><u>p</u>eptidoglycan-<u>r</u>ecognition <u>p</u>rotein SC</i>
pI	<i><u>p</u>ost <u>I</u>nfektion</i>
PRR	<i><u>p</u>attern <u>r</u>ecognition <u>r</u>eceptors</i>
PRR13	<i><u>p</u>roline-<u>r</u>ich <u>p</u>rotein 13</i>
RLRs	<i><u>R</u>etinoic acid-inducible gene (<u>R</u>IG)-<u>I</u>-like <u>r</u>eceptors</i>
RNA	<i><u>R</u>ibon<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
RPE	<i><u>R</u>-<u>p</u>hyco<u>e</u>rythrin</i>
RT-qPCR	<i><u>R</u>ea<u>l</u>-<u>T</u>ime-quantitative-PCR</i>
SEM	<i><u>S</u>tandard <u>E</u>rror of the <u>M</u>ean</i>
SDS-PAGE	<i><u>s</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate <u>p</u>olyacrylamide gel <u>e</u>lectrophoresis</i>
SMART	<i><u>S</u>imple <u>M</u>odular <u>A</u>rchitecture <u>R</u>esearch <u>T</u>ool</i>
SNAP	<i><u>S</u>ynonymous <u>N</u>on-synonymous <u>A</u>nalysis <u>P</u>rogram</i>
TGFB1	<i><u>t</u>ransforming growth <u>f</u>actor, <u>b</u>eta 1</i>
TICAM1	<i><u>T</u>IR domain-<u>c</u>ontaining <u>a</u>dapter <u>m</u>olecule 1</i>
TIR	<i><u>T</u>oll-<u>I</u>nterleukin 1 (IL1)-<u>R</u>ezeptor</i>
TLR	<i><u>t</u>oll-<u>l</u>ike <u>r</u>eceptor</i>
TNF	<i><u>T</u>umornekrose<u>f</u>aktor</i>
TOLLIP	<i><u>t</u>oll <u>i</u>nteracting <u>p</u>rotein</i>
TRAF6	<i><u>T</u>NF <u>R</u>eceptor-<u>a</u>ssoziierter <u>F</u>aktor 6</i>
TRB	<i><u>T</u> cell <u>r</u>eceptor <u>b</u>eta locus</i>
UTR	<i><u>u</u>n<u>t</u>ranslated region</i>
X-GAL	<i>5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid</i>

1. Einleitung

Fische sind für die Menschen von großer Bedeutung, da sie zum einen dem überwiegenden Teil der Weltbevölkerung als Grundnahrungsmittel dienen und zum anderen in der westlichen Welt neben dem Ernährungsaspekt auch als Genussmittel gelten. Die Fischerei und ihr verarbeitendes Gewerbe gehören global zu den bedeutendsten Wirtschaftszweigen. Von den 1950er bis in die 1990er Jahre stieg die jährliche Fangmenge weltweit von etwa 20 Mio. t auf fast 80 Mio. t (FAO, 2014).

In den letzten 20 Jahren stagnieren die Fangzahlen auf hohem Niveau. Die Steigerung der Gesamtproduktion ist allein auf die Steigerung der Aquakulturproduktion zurückzuführen.

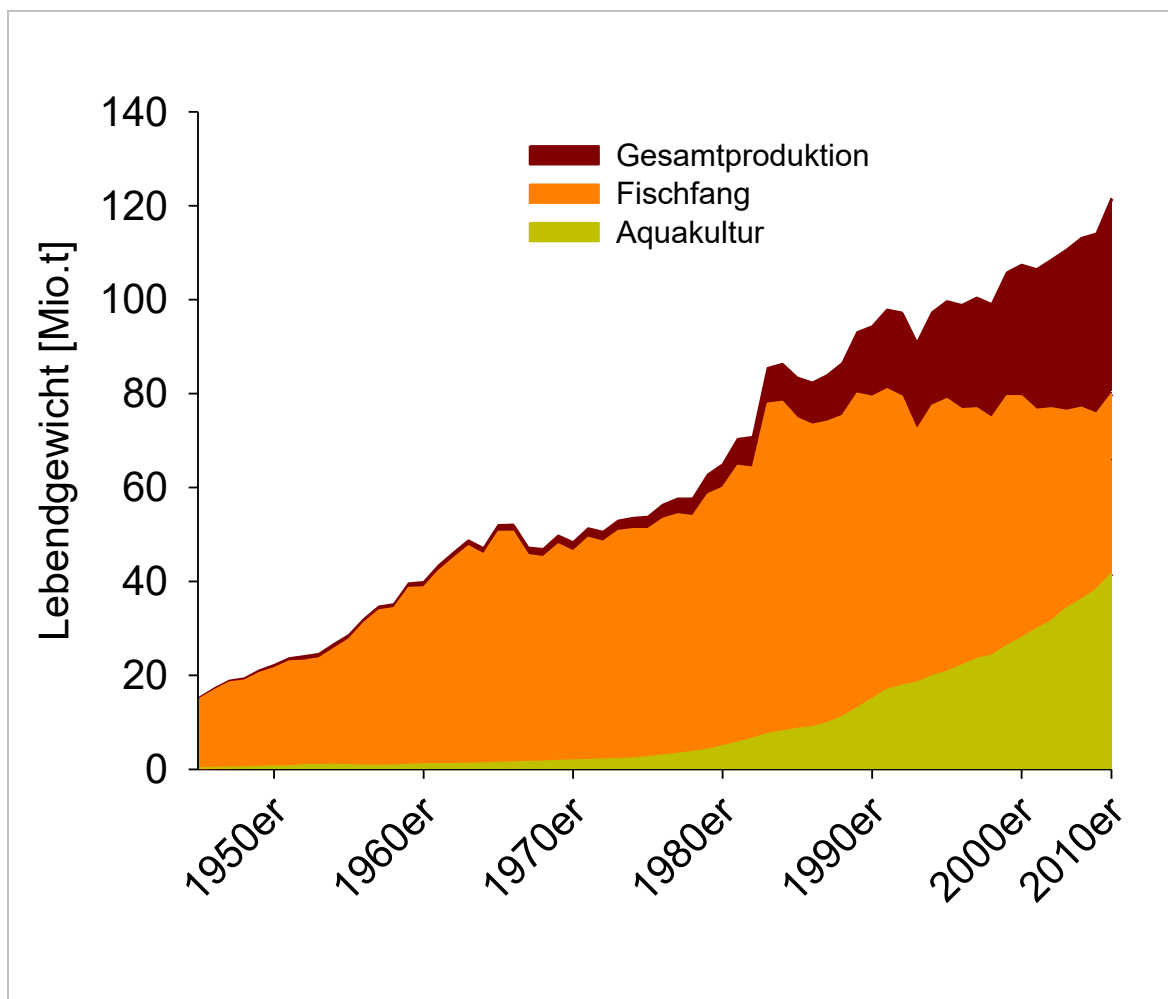


Abbildung 1: Entwicklung der Fischproduktion von 1950 bis 2011 (FAO, 2014)

Von den 120 Mio. t produziertem Fisch im Jahr 2011 kamen etwa 40 Mio. t aus der Aquakultur (Abbildung 1). Hauptursache für die Stagnation des Fischfangs ist wohl die

Überfischung der kommerziell genutzten Fischarten (OEHLenschläGER, 2010). In den 1970er Jahren lag der Anteil der überfischten oder sogar zusammengebrochenen Bestände weltweit noch bei 10 %, während dies 2009 schon fast 30 % der Gesamtfischbestände (FAO, 2012) betraf. Vor dem Hintergrund der steigenden Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden steigenden Pro-Kopf-Konsum an Fisch, sind die Prognosen für die Entwicklung der natürlichen Bestände schlecht (MARIBUS GGMBH & THE INTERNATIONAL OCEAN INSTITUTE, 2013). Soll der Bedarf an Fisch und Fischprodukten weiterhin gedeckt werden, ist es unumgänglich die Züchtung von Fischen in Aquakulturen weiter zu fördern. In der Aquakulturforschung werden Wege gesucht eine Produktionssteigerung möglichst nachhaltig zu gestalten. In weiten Teilen der Welt werden die Ökosysteme durch Aquakulturanlagen eher stärker be- als entlastet. Neben der stärkeren Eutrophierung, verursacht durch mit Nahrungsresten und Fischkot belastete Abwässer, der Verfütterung von Fischmehl und dem Einsatz von Chemikalien wie Algiziden, Molluskiziden und Desinfektionsmitteln, zählt auch der teilweise unkontrollierte Einsatz von Antibiotika zur breiten Palette der Kritikpunkte (NIKOV UND SMOLKA, 2003). Allerdings sind diese Punkte, zumindest in Europa, stark reglementiert und kontrolliert. Eine Möglichkeit die Nutzung von Chemikalien einschließlich Antibiotika einzuschränken, ist die Verwendung und Züchtung von Standort-angepassten und robusten Fischarten beziehungsweise Zuchtlinien.

In Deutschland ist besonders die zu den Salmoniden gehörende Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), mit einem Anteil von 25 % an der Gesamtaquakultur (Statistischen Bundesamt, 2011), ein beliebter Speisefisch. Von der Regenbogenforelle gibt es bereits Züchtungen, wie die Zuchtlinien „Born“ (ANDERS, 1986) und „Hofer“ (BAERWALD *et al.*, 2008), die sich durch geringere Anfälligkeit gegenüber Pathogenen auszeichnen.

Für die Optimierung der Züchtung wird es zukünftig nötig sein, durch genetische Marker Rückschlüsse auf den Zuchtwert von Individuen ziehen zu können. Der Einsatz solcher Zuchtmethoden setzt allerdings genaues Wissen über die Struktur und die Funktion der für die Züchtung relevanten Faktoren voraus.

Diese Arbeit soll einen Beitrag leisten die Struktur und Funktion solcher Gene aufzuklären, die eine zentrale Rolle im Immunsystem spielen und daher wichtig für die Robustheit der Fische sind. Hierbei sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) besonders wichtig, sowie jene Faktoren, die das TLR-Signal weiterleiten. Sie haben eine

Schlüsselfunktion bei der Pathogenerkennung und der Einleitung erster Abwehrmechanismen.

1.1 Das Immunsystem der Fische

Die Teleostei (echte Knochenfische) verfügen, ebenso wie die Mammalia (Säugetiere), über ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem. Allerdings entwickelten sich seit 440 Mio. Jahren (NELSON, 2006), nach der Trennung der Sarcopterygii (Fleischflosser; Vorläufer der Tetrapoden) von den Actinopterygii (Strahlenflosser), Immunsysteme mit verschiedenen Ausprägungen. Das adaptive Immunsystem ist bei den Säugern hoch entwickelt, bei den Fischen allerdings weniger stark ausgeprägt und in seiner Aktivierung verlangsamt (WATTS *et al.*, 2001). Niedrige Temperaturen unterdrücken die T-Helferzellen-vermittelte adaptive Immunantwort, was bei den poikilothermen Fischen besonders zum Tragen kommt (LE MORVAN *et al.*, 1998). Die Temperaturabhängigkeit der Knochenfische sowie ihr früher Kontakt mit ihrer Umwelt im embryonalen Stadium machten ein hochentwickeltes angeborenes Immunsystem unentbehrlich (ROMBOUT *et al.*, 2005). Neben den verschiedenen Umweltbedingungen, als Triebkraft der Diversifikation, führte bei den Fischen auch eine zusätzliche Genomduplikation vor etwa 350 Mio. Jahren (ROACH *et al.*, 2005) zur vielfältigeren Entwicklung von Faktoren des angeborenen Immunsystems. Bei den Lachsfischen (Salmoniden) ereignete sich eine weitere Verdopplung des Genoms vor 25 – 100 Mio. Jahren (LEONG *et al.*, 2010). Repräsentativ für diese divergente Entwicklung sind die bei allen Vertebraten vorkommenden Lysozyme, die bei den Fischen unter anderem in den mukosalen Oberflächen von Haut und Kieme gebildet werden (MAGNADOTTIR, 2006). Während dieses antimikrobielle Protein beim Säuger nur grampositive Bakterien lysiert, zeigt es bei Regenbogenforelle zusätzlich eine hohe Aktivität gegen gramnegative Bakterien (WATTS *et al.*, 2001). Außerdem werden Fisch-Lysozyme auch bei Temperaturen unter 20 °C aktiviert, was ihre Funktionalität auch bei niedrigen Körpertemperaturen gewährleistet (GRINDE *et al.*, 1988). Lysozym wird in der Regenbogenforelle von zwei Genen kodiert (MITRA *et al.*, 2003).

Neben weiteren konstitutiven Faktoren der Pathogenabwehr, wie den Defensinen, (CASADEI *et al.*, 2009) findet sich bei den Fischen auch ein mit dem Säuger vergleichbares Komplementsystem, das sofort nach dem Eindringen von Erregern

reagieren kann (NAKAO *et al.*, 2011). Die verschiedenen Komplementsystemfaktoren fördern inflammatorische Prozesse, lysieren Pathogene und vermitteln die Phagozytose durch Immunzellen, wie Granulozyten und Makrophagen, indem sie die Erreger opsonisieren (LE FRIEC UND KEMPER, 2009).

Die spezifischen molekularen Muster der Mikroorganismen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs) werden bei allen Vertebraten durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt, die auf den extra- und intrazellulären Membranen lokalisiert sind (TAKEUCHI UND AKIRA, 2010). Eine große Gruppe dieser PRRs sind die TLRs). Jeder Pathogenrezeptor bindet spezifisch an seine Liganden und aktiviert die mit ihm assoziierte Signalkaskade (OSHIUMI *et al.*, 2008). Die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*) leitet die Expression verschiedener immunrelevanter Faktoren ein (HUXFORD UND GHOSH, 2009; KAWAI UND AKIRA, 2010). Ein großer Teil dieser Faktoren, vor allem die Zytokine, tragen zur Proliferation, Differenzierung und Rekrutierung von verschiedenen Immunzellen bei (ZHU *et al.*, 2013). Fische exprimieren Zytokine, wie Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Chemokine (URIBE *et al.*, 2011). Das „unspezifische“ zelluläre Immunsystem ist bei den Fischen hoch entwickelt. Es verfügt über Makrophagen sowie über zwei Typen von Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)-Homologe, den nichtspezifischen zytotoxische Zellen und den NK-ähnlichen Zellen (FISCHER *et al.*, 2013). Es gibt weiterhin drei verschiedene Granulozytentypen, die über Exozytose und Phagozytose unspezifisch auf Bakterien, Parasiten und Pilze reagieren (ZAPATA *et al.*, 1996). Antigen präsentierende Zellen (Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten) vermitteln die Kommunikation zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem (BASSITY UND CLARK, 2012).

Fundamental für die adaptiven Immunfunktionen sind die Haupthistokompatibilitätskomplexe (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) I und II, die auch bei den Teleostei Antigene an den Zellmembranen präsentieren (SUNYER, 2013). Weiterhin konnten verschiedene T-Lymphozytenpopulationen (zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen) in verschiedenen Fischarten nachgewiesen werden (CASTRO *et al.*, 2011). Darüber hinaus verfügen Fische auch über B-Lymphozyten, die verschiedene Immunglobuline exprimieren und damit eine humorale Immunantwort einleiten können (YE *et al.*, 2013).

1.2 Die Aktivierung der Immunantwort

Rezeptoren erkennen molekulare Muster von Pathogenen

Beide Äste der Immunantwort, das angeborene und das adaptive Immunsystem, wirken zusammen, um die effektive Beseitigung von eingedrungenen Mikroorganismen zu gewährleisten (RAUTA *et al.*, 2012). Für die Aktivierung des Immunsystems muss der Organismus molekulare Muster von Mikroorganismen (PAMPs) erkennen (BOLTAÑA *et al.*, 2011). Hierfür verfügen Fische über eine ganze Reihe von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), die Pathogene erkennen und eine Immunreaktion auslösen (KAWAI UND AKIRA, 2010). Die PRRs sind eine große Gruppe von Rezeptoren, die neben exogenen Faktoren auch die endogenen DAMPs (*damage-associated molecular pattern*) erkennen können, die durch Zellschädigung freigesetzt werden (KRISHNAN *et al.*, 2007). Es sind gegenwärtig vier PRR-Familien bekannt und sie wurden auch bei Fischen beschrieben. Die RLRs (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*; AOKI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015) sind, wie auch die NLRs (*NOD-like receptors*; LI *et al.*, 2012; SWAIN *et al.*, 2013), zytoplasmatisch lokalisierte Rezeptoren. Die CLCs (*C-type lectin receptors*), sowie die TLRs, sind dagegen membranständig (TAKEUCHI UND AKIRA, 2010). Während CLRs für die Erkennung von Pilzen, RLRs für die Erkennung von RNA-Virus-Partikeln und NLRs für die Erkennung bakteriellen Mustern zuständig sind, haben die TLRs im Laufe der Evolution eine breite Palette an paralogen Rezeptoren entwickelt, die ein großes Spektrum von Liganden binden können (TAKEUCHI UND AKIRA, 2010). Die TLRs spielen nicht zuletzt durch ihre Vielseitigkeit eine bedeutende Rolle unter den Pathogenrezeptoren (BUCHMANN, 2014).

Die TLRs bilden die größte Familie unter den Pathogenrezeptoren

Die TLRs sind eine evolutionär sehr alte Familie von Pathogenrezeptoren. Sie werden in sehr verschiedenen Zelltypen exprimiert (HOFFMANN, 1999). Bereits die Porifera (Schwämme) verfügten über einen TLR-homologen Faktor und damit über eine antimikrobielle Abwehr (WIENS *et al.*, 2007). Der für die Namensgebung der Toll-like-Rezeptoren verantwortliche Toll-Rezeptor wurde erstmals im Genom der Schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) gefunden (ANDERSON *et al.*, 1985). Dieser Faktor ist nicht nur für die Ausbildung der dorsoventralen Polarität

während der Embryonalentwicklung zuständig, sondern auch für Erkennung von grampositiven Bakterien und Pilzen (GANGLOFF *et al.*, 2003; LEMAITRE *et al.*, 1997). Alle TLRs sind Typ1-Transmembranproteine, aufgebaut aus einer Ektodomäne mit den charakteristischen LRRs (*leucine-rich repeat*), einer Transmembrandomäne und einer für die Bindung der nachgeschalteten Faktoren verantwortlichen intrazellulären TIR- (Toll-Interleukin 1 (IL1)-Rezeptor) Domäne (KAWAI UND AKIRA, 2010).

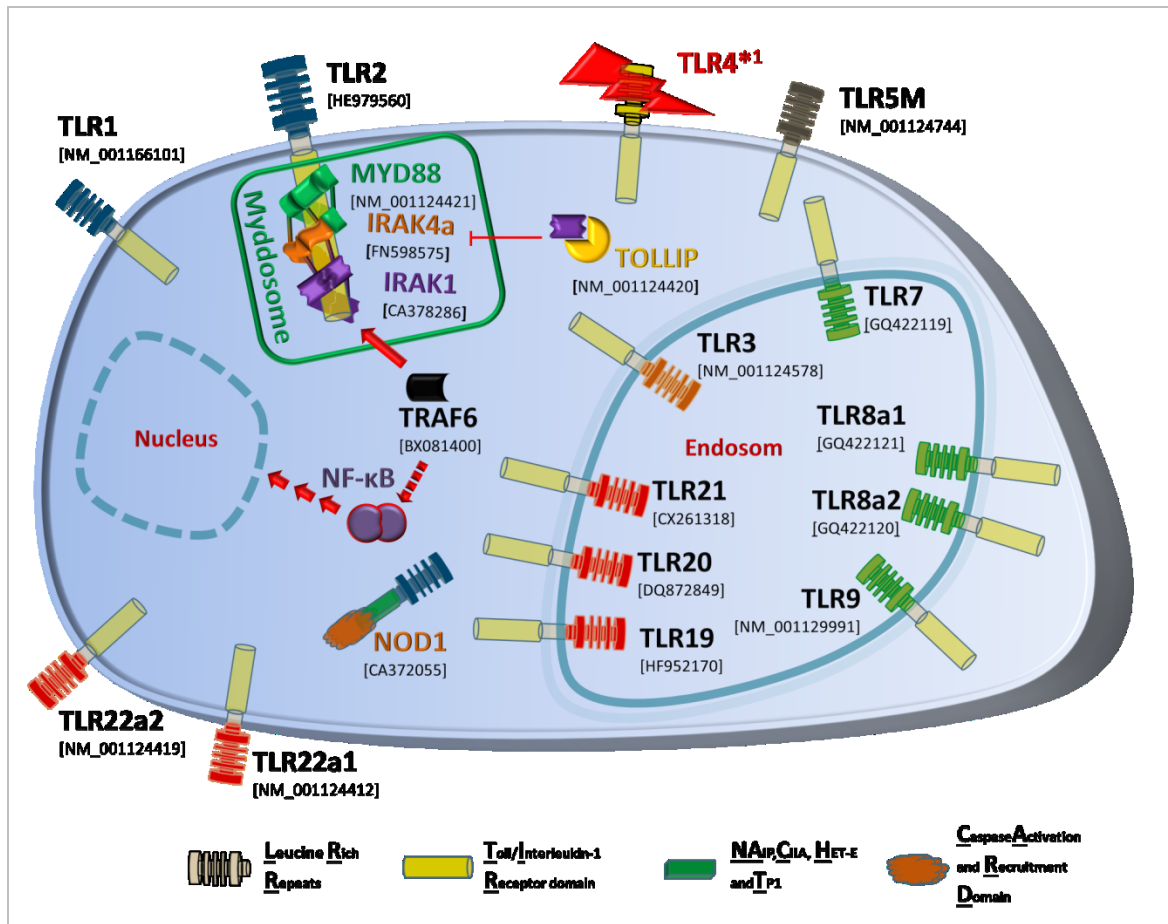


Abb.: Lokalisation der Faktoren der TLR-Signalkaskade in der Regenbogenforelle

Abgebildet sind die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren (TLRs und NOD1) sowie die intrazellulären Faktoren der MYD88-abhängigen TLR-Signaltransduktion (MyD88, IRAKs, TRAF6 und TOLLIP). Die Lokalisation der Faktoren, die auch beim Säuger bekannt sind, wurde (O'NEILL *et al.*, 2013) entnommen. TLR19, 20 und 21 sind endosomale Rezeptoren (KEESTRA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014). TLR22 ist mit der Zellmembran assoziiert (MATSUO *et al.*, 2008; SEYA *et al.*, 2009). Die Faktoren MYD88, IRAK4 und IRAK1 formieren sich im Säugermodell bei Aktivierung des TLRs zum sogenannten Myddosom.

*¹ TLR4 wurde nur bei Fischen der Familie *Cyprinidae* gefunden. Die entsprechenden Referenzsequenzen sind angegeben.

Es sind sechs TLR-Familien (TLR 1, 3, 4, 5, 7 und 11) beschrieben, die bei allen Vertebraten vorkommen (ROACH *et al.*, 2005). Unterschiede innerhalb der Vertebraten zeigen sich zum einen im Nachweis von ausschließlich piscinen TLRs (TLR 14, 21, 22 und 23) und zum anderen darin, dass die bei Säugern vorkommenden TLR 6 und 10 bei Teleostern fehlen (REBL *et al.*, 2010).

Im Genom der Forelle wurden schon zahlreiche Vertreter aller TLR-Familien identifiziert (AOKI *et al.*, 2013; REBL *et al.*, 2010a). Zu diesen gehören die TLRs 1, 2, 3, 5M, 7, 8a1, 8a2, 9, 19, 20, 21, 22a1 und 22a2 (Abbildung 2).

TLRs binden spezifische Liganden

Die zentrale Bedeutung der TLRs spiegelt sich, abgesehen von der großen Diversität dieser Rezeptoren, auch in ihrer Expression sowie dem großen Spektrum ihrer Liganden wider. TLRs werden von Epithelzellen exprimiert und befähigen diese Entzündungsreaktionen auszulösen (TAKEUCHI UND AKIRA, 2010). Sie werden aber auch von Immunzellen exprimiert, um Pathogene aufzufinden (ABÓS *et al.*, 2013; TAKEDA UND AKIRA, 2005). Bei Kontakt mit einem Mikroorganismus bindet ein spezifischer PAMP nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an den entsprechenden TLR und aktiviert den TLR-Signalweg (DI GIOIA UND ZANONI, 2014). In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisierung zweier Rezeptoren (TLRs bilden Hetero- und Homodimere) entscheidend für das Auslösen der Signaltransduktion ist (JIN *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009). Weiterhin müssen einige TLRs durch Glykosylierung der Ektodomäne posttranslational modifiziert werden, um die Ligandenbindung zu gewährleisten (WEBER *et al.*, 2004). Während beim Fisch Ligandenspezifität bisher nur für den Flagellin-Rezeptor TLR5 nachgewiesen ist (TSUJITA *et al.*, 2004), finden sich beim Säuger zahlreiche Nachweise (Tabelle 1) für die spezifische Interaktion von Liganden und Rezeptoren (TAKEUCHI UND AKIRA, 2010).

Tabelle 1: Die TLRs der Säuger und ihre Liganden

TLR-Familie	TLRs	Ligand	Referenz ohne klammer
TLR1 (Zellwandbestandteile von grampositiven und -negativen Bakterien)	TLR1	diacetylierte Lipopeptide	TAKEDA <i>et al.</i> , 2002; HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2006; MITSUZAWA <i>et al.</i> , 2001
	TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide, Peptidoglykan	
TLR3	TLR3	doppelsträngige RNA	BELL <i>et al.</i> , 2006
TLR4	TLR4	Lipopolysaccharide (LPS)	LIAUNARDY-JOPEACE AND GAY, 2014
TLR5	TLR5M	Flagellin	HAYASHI <i>et al.</i> , 2001
TLR7 (virale Nukleinsäuren)	TLR7	einzelsträngige RNA	KAWAI UND AKIRA, 2007
	TLR8	einzelsträngige RNA	
	TLR9	virale DNA	
TLR11	TLR11	Profilin	LAUW <i>et al.</i> , 2005

TLR2 erkennt Zellwandbestandteile von Bakterien

Der TLR2 ist bei den Säugern verantwortlich für die Erkennung von grampositiven Bakterien und damit essenziell für die erfolgreiche Abwehr einer ganzen Reihe von Erkrankungen bei Menschen und Tieren (BASTO UND LEITÃO, 2014). Es gibt Nachweise für die spezifische Aktivierung des Rezeptors durch Lipoproteine sowie Peptidoglykan (Tabelle 1). Bei verschiedenen Fischarten gibt es zumindest Hinweise auf eine ähnliche Funktion des TLR2 (ZHANG *et al.*, 2014).

Rekonstitution der TLR-Signaltransduktion in HEK293-Zellen

Die großen strukturellen Ähnlichkeiten der spezifischen TLRs und ihre eindeutige phylogenetische Einordnung (ZHANG *et al.*, 2014) lassen zwar auf Funktionsgleichheit schließen, doch gibt es zur Liganden-Rezeptor-Interaktion beim Fisch nur wenige Untersuchungen. Dagegen zeigen zahlreiche Untersuchungen mit unterschiedlichen Fischpathogenen und an verschiedenen Fischarten, dass Infektionen die Expression und Aktivierung von TLR-Faktoren induzieren können (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014). Dieses wurde auch bei Säugern (FULLER *et al.*, 2007; OKABAYASHI *et al.*, 2006; TSUJIMOTO *et al.*, 2005), Vögeln (CONG *et al.*, 2013) und Invertebraten (DEEPIKA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012) beschrieben. Dieses Phänomen kann allerdings nur als ein erster Indikator für eine Liganden-spezifische Aktivierung eines bestimmten TLRs bewertet werden (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014). Um die Rezeptoren funktional zu charakterisieren, wird häufig die HEK293 (*human embryonic kidney*) -Zelllinie verwendet.

Die HEK293 eignet sich besonders gut für Transfektionen und ist für die Untersuchung rekombinanter Proteine essenziell geworden (BÜSSOW, 2015). Darüber hinaus exprimiert die HEK293 weder TLR2 noch TLR4, was sie zum etablierten Modell für funktionale Untersuchungen der Rezeptoren beim Säuger gemacht hat (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006). Mit diesem Rekonstitutionssystem wurden bereits Lipoproteine und Peptidoglykan als Liganden des Karpfen-TLR2 nachgewiesen (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Durch genaue Kenntnis der Liganden der Säuger-TLRs ist es mittlerweile möglich, einige Nebenwirkungen bei Impfungen zu erklären (KAISHO AND AKIRA, 2002). Darüber hinaus sind einige Liganden der TLRs durch ihre immunstimulierende Wirkung bei der Impfstoffentwicklung wirksame Adjuvantien (BASTO UND LEITÃO,

2014). In ersten Untersuchungen an Fischlarven resultierte die Applikation von synthetischen Immunstimulanzien in einer besseren Überlebensrate und verbessertem Wachstum der Brut (BRICKNELL AND DALMO, 2005).

1.3 Die Rekrutierung der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade

Nach der Aktivierung eines TLRs erfolgt die Rekrutierung von Adaptermolekülen an die TIR-Domäne (ROACH *et al.*, 2013). Der Faktor TICAM1 (*TIR domain-containing adapter molecule 1*) wird beim Säuger speziell vom TLR3 gebunden und führt vorzugsweise zur Aktivierung des IFN (Interferon)- β -Promotors und damit zur Virusabwehr (YAMAMOTO *et al.*, 2002). Bei allen anderen TLRs erfordert die Aktivierung der Signalkaskade die Rekrutierung des sogenannten Myddosoms (LIN *et al.*, 2010). Das Myddosom ist ein helikal angeordnetes Oligomer (Abbildung 2), das sich aus sechs Molekülen des Adapters MYD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), vier Molekülen des IRAK4 (Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4)-Faktors sowie vier weiteren Molekülen des IRAK2- beziehungsweise IRAK1-Faktors zusammensetzt (GAY *et al.*, 2011). Der MYD88-Faktor verfügt über eine C-terminale TIR-Domäne und geht mit dem TLR eine Domänenbindung ein (AKIRA *et al.*, 2006). Über die N-terminale Todesdomäne interagiert MYD88 mit den nachgeordneten IRAK-Faktoren (DEGUINE UND BARTON, 2014).

Das IRAK4 ist eine Schlüsselkinase des angeborenen Immunsystems

Die IRAK-Faktoren sind Serin-Threonin-Protein-Kinasen (FLANNERY UND BOWIE, 2010). Von den vier IRAK-Faktoren ist IRAK4 (LI *et al.*, 2002) als Schlüsselkinase ein Hauptregulator der TLR-Signaltransduktion (RINGWOOD UND LI, 2008). Seine Bindung an MYD88 führt zur Autophosphorylierung. Dies ermöglicht durch Konformationsänderung die Phosphorylierung von IRAK2 oder alternativ IRAK1 (NEUMANN *et al.*, 2008). Der IRAK2-Faktor wurde bisher in keinem der veröffentlichten Fischgenome gefunden. Vermutlich kommt er bei den Fischen nicht vor. IRAK1 ist im nicht infizierten Organismus an das regulatorische Protein TOLLIP gebunden und wird dadurch vor Autophosphorylierung geschützt (ZHANG UND GHOSH, 2002). Durch die Rekrutierung von IRAK1 wird TOLLIP ubiquitiniert und dissoziiert aus dem

Rezeptorkomplex (BURNS *et al.*, 2000). TRAF6 dient als Überträger des Signals vom Membrankomplex hin zu den cytosolischen Faktoren der TLR-Signalkaskade. Der Faktor bildet mit dem phosphorylierten IRAK1 einen Komplex und dissoziiert von der Membran (JANSSENS UND BEYAERT, 2003). Über eine Reihe von nachgeschalteten Faktoren wird der NF- κ B-Transkriptionsfaktor aktiviert. Dieser ist ein Hauptregulator der Immunantwort (HUXFORD UND GHOSH, 2009; KAWAI UND AKIRA, 2010).

1.4 Die Rolle der Zytokine

Nach seiner Aktivierung wandert der NF- κ B-Transkriptionsfaktor in den Nucleus, bindet an die Promotoren einer Vielzahl immunrelevanter Gene (KARIN UND LIN, 2002) und induziert die Expression von Zytokinen, wie Interleukinen, Tumornekrosefaktoren und Wachstumsfaktoren (VALLABHAPURAPU UND KARIN, 2009).

Zytokine sind eine diverse Gruppe von Proteinen, die schon bei den basalen Invertebraten wichtige Funktionen bei unterschiedlichen Immunprozessen ausüben (BUCHMANN, 2014). Interleukin-1 β (IL1B; PLEGUEZUELOS *et al.*, 2000; SECOMBES *et al.*, 1999), Tumornekrosefaktor- α (TNF; LAING *et al.*, 2001), die Interleukine-8 (IL8; LAING *et al.*, 2002; REBL *et al.*, 2014) und -10 (IL10; INOUE *et al.*, 2005) und der *transforming growth factor* β 1 (TGFB1; HARDIE *et al.*, 1998) der Regenbogenforelle wurden bereits beschrieben und funktional charakterisiert.

IL1B aktiviert die Akute-Phase-Reaktion (MARCH *et al.*, 1985) und induziert Fieber (KAMPSCHMIDT, 1984). Der multifunktionale Tumornekrosefaktor leitet die Makrophagendifferenzierung ein (HEHLGANS UND PFEFFER, 2005) und aktiviert die Phagozytose (MURRAY *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist TNF eine wichtige Schnittstelle des angeborenen Immunsystems mit dem Apoptose-System (CABAL-HIERRO UND LAZO, 2012). Der Botenstoff IL8 initiiert die chemotaktische Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und fördert ihre Migration vom peripheren Blut in die infizierten Gewebe (BAGGIOLINI *et al.*, 1989). Das Zytokin IL10 hat beim Menschen eine Vielzahl regulatorischer Funktionen und wird von diversen Blutzellen exprimiert (INOUE *et al.*, 2005). Es wirkt hauptsächlich immunsuppressiv. Beispielsweise hemmt es die Zytokinsynthese verschiedener Immunzellen (CONTI *et al.*, 2003). TGFB1 ist ebenfalls ein regulatorisches Zytokin und bei Säugern für die Überwachung der Zellproliferation und -differenzierung von vielen Zelltypen verantwortlich (SPORN *et al.*, 1986).

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes (Projektnummer SE 326/16-1) angefertigt und charakterisiert Schlüsselfaktoren des angeborenen Immunsystems der Salmoniden sowie deren Regulation im Verlauf einer Infektion mit dem Fischpathogen *Aeromonas salmonicida*. Die vergleichenden immunologischen Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogen-abhängigen Aktivierung von Faktoren des TLR-vermittelten Signalweges bei Salmoniden leisten. Die drei Hauptziele dieser Dissertation sind daher:

1. Strukturelle und funktionale Charakterisierung des TLR2 der Regenbogenforelle

Die TLR2-kodierende DNA-Sequenz soll isoliert, sequenziert und funktional charakterisiert werden. Durch Strukturvergleiche auf DNA-, cDNA- und Aminosäureebene sowie durch phylogenetische Analysen soll die Evolution des Rezeptors betrachtet werden. Mit Hilfe von Expressionsklonierung und Reportergeranalysen in der HEK293-Modellzelllinie sollen die Pathogen-spezifischen Liganden des Forellen-TLR2 *in vitro* ermittelt werden. Die Regulation des Faktors soll *in vivo* im Infektionsmodell untersucht werden.

2. Strukturelle und funktionale Charakterisierung des IRAK4 in Regenbogenforelle, Ostseeschnäpel und Atlantischem Lachs

Die Schlüsselkinase der TLR-Signalkaskade soll analog zum TLR2 strukturell und funktional charakterisiert werden. Durch *in vitro* und *in vivo* Ansätze soll geklärt, werden ob das IRAK4 bei Säuger und Fisch Funktions-homolog ist.

3. Ermittlung von Schlüsselfaktoren bei der Abwehr von gramnegativen Bakterien

Mit Hilfe eines etablierten bakteriellen Infektionsmodelles (*A. salmonicida* Infektion) soll die Regulation einer ganzen Reihe von TLRs, nachgeschalteter Faktoren der TLR-Signalkaskade sowie diagnostischer Zytokine auf der mRNA-Ebene analysiert werden. Die infektionsabhängige Modulation der Expression dieser Faktoren verspricht Hinweise auf die Evolution der Pathogenerkennung zu geben. Die Ermittlung von Schlüsselfaktoren des angeborenen Immunsystems der Salmoniden könnte als Basisinformation für die Entwicklung von Praxis-tauglichen Biomarkern dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die genetischen Untersuchungen wurden adulte Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Selektionslinie „steelhead“; Troutlodge, Tacoma, USA), Ostseeschnäpel (*Coregonus maraena*) und Atlantischer Lachs (*Salmo salar*) von lokalen Aquakulturanlagen (Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Born; Teichwirtschaft Frauenmark; Forellen- und Lachszucht Ermisch; Neustadt in Sachsen) bezogen. Die Firma Zyagen lieferte die Lachs-DNA (*Salmon Genomic DNA*; Katalognr.: GFS-190F/GFS-190M).

2.1.2 Enzyme, Chemikalien, Reagenziensätze, Oligonukleotide

Tabelle 2: Verzeichnis der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I (10 µl DNase, 70 µl RDD-Puffer)	QIAGEN, Hilden, D
<i>Expand Long Template Enzyme Mix</i>	Roche, Basel, CH
<i>FastStart Taq DNA Polymerase</i>	Roche, Basel, CH
OneTaq® DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Proteinase K	MERCK, Darmstadt, D
RNase A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
RNase T1	Roche, Basel, CH
SuperScript II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	Biochrom, Berlin, D
T4 DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Restriktionsendonukleasen:	
<i>BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, SpeI, XbaI</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>DraI, EcoRV, PvuI, StuI</i>	Clontech, Mountain View, Ca, USA

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenziensätze, Oligonukleotide sowie die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien finden sich in tabellarischer Form im Anhang 2.

2.1.3 Infektionsversuch

Für den Infektionsversuch wurden adulte *steelhead*-Forellen bei 15 °C in 300-Liter-Tanks einer Teilkreislaufanlage (Rezirkulation des mechanisch gereinigten und mit Sauerstoff angereicherten Wassers) gehalten. Die Wasserqualität wurde täglich geprüft; die Licht-/Dunkelperiode betrug jeweils 12 h und die Fische wurden mit kommerziellen Trockenpellets gefüttert.

Die kryokonservierten gramnegativen *A.salmonicida* subsp. *salmonicida* (Wildtypstamm JF 2267) wurden von der Firma *Microbank*, PRO-LAB *Diagnostics* (Cheshire, UK) geliefert. Nach einer Vorinkubation (15 °C, 98 h) auf CASO (*Casein-peptone Soymeal-peptone*)-Schrägagar wurden die Bakterien in einer Flüssigkultur in LB (*lysogeny broth*)-Medium für weitere 48 h vermehrt. Die Reinheit der Bakterienkultur wurde mit Gramfärbung und Betrachtung der Zellmorphologie validiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 4300 U/min zentrifugiert (4 °C, 10 min), das Pellet in steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Es wurden 1×10^8 Bakterien / ml resuspendiert. Der Titer wurde durch das Auszählen von koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Inkubation auf CASO-Agar Platten validiert.

Wir injizierten letale Dosen um eine in allen Fischen möglichst einheitliche physiologische Reaktion hervorzurufen. Eine Gruppe von Fischen (n = 30) wurde durch intraperitoneale Injektion mit 1×10^7 Bakterien / ml, gelöst in 200 µl PBS (*Phosphate buffered saline*), infiziert. Einer Kontrollgruppe wurden nur PBS verabreicht. Aus beiden Gruppen wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72 h pI (*post* Infektion) jeweils fünf Fische beprobt.

Die intraperitoneale Injektion und die Anästhesierung der Forellen mit Phenoxyethanol vor der Probennahme wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (§ 4(3) TierSchG) durchgeführt. Der Tierversuch (LALLF: M-V/TSD/7221.3-2.5-008/10) wurde ordnungsgemäß beantragt und bewilligt.

Die entnommenen Gewebeproben (Milz, Kopfnieren, Leber und Thymus) wurden schockgefroren und in Flüssigstickstoff gelagert.

2.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1 Isolation von RNA aus Geweben

Für die Isolation von RNA sollten ausschließlich RNase-freie Gebrauchsmaterialien und Chemikalien verwendet werden. Die Entfernung der RNasen am Arbeitsplatz erfolgte mit RNase-ExitusPlus™. Das QIAzol Lysis Reagent gewährleistet eine saubere RNA-Isolation. Der Phenolanteil dient der Abtrennung von DNA und Proteinen. Das in dem Reagenz enthaltene Guanidin-isothiocyanat denaturiert die in den Geweben enthaltenen RNasen. Von den in Flüssigstickstoff gelagerten Geweben wurden etwa 100 mg, ebenfalls unter Flüssigstickstoff, mit dem Mörser fein zerrieben, in 900 µl QIAzol Lysis Reagent aufgenommen und mit dem Ultra-Turrax®T25 basic homogenisiert. Nach einer Ruhezeit von 5 min setzten wir 100 µl der gDNA Eliminator solution zur Fällung der DNA hinzu und vortexten 15 sek. Das Homogenat wurde nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min, 12000 g, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl 70 % Ethanol versetzt. Die mit der Pipette gemischte Lösung wurde zur Hälfte auf die im Kit mitgelieferten RNeasy Mini *spin column* (Säule im 2ml Reaktionsgefäß) gegeben und zentrifugiert (15 sek, 8000 g, RT). Der Vorgang wurde mit der zweiten Hälfte der Lösung wiederholt. Der Durchfluss wurde verworfen. Die an den Filter gebundene RNA wurde in diversen Waschschritten (Tabelle 3) mit den im Kit enthaltenen Puffern aufgereinigt.

Tabelle 3: Aufreinigungsschritte der RNA-Präparation

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	700 µl Puffer RWT	zentrifugieren (15 sek, 8000 g, RT); Durchfluss verwerfen
2	500 µl Puffer RPT	zentrifugieren (15 sek, 8000 g, RT); Durchfluss verwerfen
3	500 µl Puffer RPT	zentrifugieren (2 min, 8000 g, RT); Durchfluss verwerfen
4		Säule in ein 1,5 µl Reaktionsgefäß stellen
5	30-50 µl DEPC-H ₂ O	zentrifugieren (1 min, 8000 g, RT)
6		Lösung erneut in die Säule geben
7		zentrifugieren (1 min, 8000 g, RT)

Nach der Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA wurde zur Qualitätsabsicherung eine Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.2 Isolation von DNA aus Geweben

Für die Präparation der DNA wurden zunächst 250 mg Gewebe unter Flüssigstickstoff gemörsert und in 3 ml Proteinase K- Reaktionspuffer aufgenommen. Die Serinprotease wirkt als Exo- und Endopeptidase und zersetzt Proteine zu aromatischen, hydrophoben und aliphatischen Aminosäuren. Nach Inkubation über Nacht (56 °C) folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Tabelle 4) zur Beseitigung der Proteinreste. Die DNA wurde darauf mit Isopropanol und Natriumacetat gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und etwa auf eine Konzentration $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Konzentration und die Reinheit der DNA (Quotient aus OD260 / 280) wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop®ND-1000 bestimmt.

Tabelle 4: Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
	DNA in 500 μl H_2O	
1	500 μl Phenol	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), wässrige Phase abnehmen
2	500 μl PCI	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), wässrige Phase abnehmen
3	500 μl CI	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), wässrige Phase abnehmen
4	50 μl Natriumacetat (pH 6,3)	
5	500 μl Isopropanol	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), Pellet dekantieren
6	500 μl 70 % Ethanol	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), Pellet dekantieren
7	500 μl 70 % Ethanol	zentrifugieren (10 min, 14000 rpm), Pellet trocknen
8	ad H_2O	

2.2.3 Primerdesign

Primer sind Oligonukleotide, die als Ansatzpunkte für Polymerasen oder Reverse Transkriptase dienen. Sie sind somit eine Grundvoraussetzung für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Entscheidend für die Auswahl der Nukleotidsequenz ist ihre Bindungsspezifität sowie -stabilität mit der DNA-Matrize. Das Design erfolgte durch die Verwendung der Pyrosequencing Assay Design software v.1.0.6 (Biotage, Uppsala, Sweden). Die Voreinstellungen des Programms wurden so gewählt, dass nur *Primer* generiert wurden, die über 20 bis 25 Basen verfügten und einen GC-Gehalt zwischen 40 und maximal 60 % hatten. Weiterhin wurden die *Primer* so gewählt, dass ihre Schmelztemperatur einheitlich zwischen 64 und 66 °C lagen und unter den letzten fünf Basen am 3'-Ende möglichst G- oder C-Nukleotide überwogen. Diese sogenannte GC-Klammer verbessert die Bindungsstabilität der Oligonukleotide.

Wenn keine Sequenzinformationen für das zu isolierende DNA-, oder cDNA-Fragment der Zielspezies vorliegen, bietet das Ableiten von degenerierten *Primern* eine Möglichkeit das entsprechende Fragment zu erhalten. Beim Ableiten von degenerierten *Primern* werden die entsprechenden Sequenzen anderer Spezies miteinander verglichen und Sequenzunterschiede ermittelt. Darauf wird ein *Primergemisch* synthetisiert, das an den betreffenden Positionen zwei, drei oder vier verschiedene Basen aufweist. Um die Vieldeutigkeiten in den Sequenzen darzustellen wurde der *Ambiguity Code* vom Nomenklaturkomitee der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* genutzt. Der Buchstabe Y steht für die Pyrimidine Cytosin und Thymin, K steht für Ketogruppe (Guanin und Thymin), S (Strong) steht für Basen mit 3 H-Brücken (Guanin und Cytosin), M steht für Aminogruppe (Adenin und Cytosin) und R steht Purine (Adenin und Guanin).

Für die Ableitung der *Primer*, die insbesondere in der Expressionsklonierung verwendet wurden, war es nötig auch *Primer* an den 3'- bzw. 5'-Enden abzuleiten. In diesem Zusammenhang wurden die Basen abgezählt und die Schmelztemperatur durch die „Wallace-Regel“ $[T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T) + 4^{\circ}\text{C}(G + C)]$ berechnet.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung gering konzentrierter cDNAs und spezifischer Genabschnitte. Sie fand Verwendung bei der Isolation unbekannter DNA-Sequenzen (Genome Walking, RACE) sowie von DNA-Fragmenten für die Klonierungsexperimente. Die PCR wurde weiterhin für die Quantifizierung von cDNA-Kopien (RT-qPCR) genutzt.

Das Grundprinzip der PCR, bestehend aus Denaturierung der DNA, *Primer-Annealing* und Elongation, führt innerhalb eines Zyklus zur Verdopplung des DNA-Stranges. Die Kopienzahl der Zielsequenz steigt im Verlauf der Zyklenwiederholung exponentiell an. Im Verlaufe der Arbeit fanden verschiedene Polymerasen Verwendung. Die Reaktionsmischungen wurden nach den Protokollen der Reagenziensätze hergestellt.

2.2.4.1 Standard-PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge unter 1,5 kb verwendeten wir die *Fast start Taq* DNA Polymerase oder die *One Taq Hot start*. Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 5 pipettiert.

Tabelle 5: Pipettierschema für eine Standard-PCR

Reagenz (<i>Fast start Taq</i>)	Einsatz	Reagenz (<i>One Taq</i>)	Einsatz
PCR-Puffer	2,5 µl (10 x)		
dNTPs	1 µl (5 mM)		
<i>Fast start Taq</i>	0,1 µl (5 U / µl)	<i>One Taq Mix</i>	12,5 µl
DNA Polymerase			
<i>forward-Primer</i>	1 µl (25 pmol / µl)		1 µl (25 pmol / µl)
<i>reverse-Primer</i>	1 µl (25 pmol / µl)		1 µl (25 pmol / µl)
Probe DNA / cDNA	100 ng / 250 ng		100 ng / 250 ng
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl		ad 25 µl

Die PCR erfolgte unmittelbar nach Überführung der fertigen PCR-Ansätze in einen *Thermocycler* T3000 der Firma Biometra. Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

Tabelle 6: Standard-PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5 min	-
Denaturierung	94	30 s	
Primer-Annealing	60	30 s	30
Elongation	72	1 min / kb	
Abschließende Elongation	72	5 min	-

2.2.4.2 Long-Template-PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Längen über 1,5 kb verwendeten wir den *Expand Long Template Enzyme Mix*. Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 7 pipettiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für eine Long-Template-PCR

Reagenz	Einsatz
Puffer 1/2/3	5 µl (10 x)
dNTPs	7 µl (35 µM)
<i>Expand Long Template Enzyme Mix</i>	0,75 µl (5 U / µl)
<i>forward-Primer</i>	1 µl (25 pmol / µl)
<i>reverse-Primer</i>	1 µl (25 pmol / µl)
Probe DNA / cDNA	100 ng / 250 ng
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Die *Long Template* PCR erfolgte wie in Tabelle 8 beschrieben. Es wurden keine Fragmente größer als 3 kb amplifiziert.

Tabelle 8: *Long-Template*-PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	7 min	-
Denaturierung	94	1 min	30
Primer-Annealing	60	30 s	
Elongation	72	1 min / kb	
Abschließende Elongation	72	10 min	-

Folglich waren keine Optimierungen, wie beispielsweise das Herabsetzen der Elongationstemperatur, nötig. Die Denaturierungszeiten wurden im Vergleich zur Standard-PCR erhöht.

2.2.4.3 *Touch-down*-PCR

Bei RACE-Experimenten oder bei der Verwendung degenerierter *Primer* ist es in der Regel erforderlich die Spezifität der PCR zu erhöhen. Die *Touch-down*-PCR ist eine PCR-Variante, die dies gewährleistet. Im ersten Teil dieser PCR-Variante wird die *Annealing*-Temperatur im Laufe von 10 Zyklen um je 1 °C gesenkt. Die Ausgangstemperatur ist deutlich höher als der berechnete Schmelzpunkt der *Primer*. Durch das „Herantasten“ an die optimale *Annealing*-Temperatur binden die *Primer* mit der höchsten Sequenzübereinstimmung vorzugsweise an die Zielmatrize. An die initialen Zyklen schließt eine Standard-PCR direkt an, in der das voramplifizierte PCR-Fragment weiter verstärkt wird. Die PCR-Ansätze wurden analog zur Standard-PCR pipettiert (Tabelle 9). Die *Touch-down*-PCR wurde nach folgenden Parametern programmiert:

Tabelle 9: *Touch-down*-PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5 min	-
Denaturierung	94	30 s	11
Primer-Annealing	68 ¹	30 s	
Elongation	72	1 min / kb	
Denaturierung	94	30 s	29
Primer-Annealing	60	30 s	
Elongation	72	1 min / kb	
Abschließende Elongation	72	10 min	-

¹ (-1 °C je Zyklus)

2.2.4.4 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Um Informationen über die mRNA (Sequenz oder Kopienzahl) zu erhalten, muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die für die PCR genutzten Polymerasen sind DNA-spezifisch und demnach nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Das Umschreiben der RNA kann durch Reverse Transkriptasen gewährleistet werden. Diese Enzyme können einen RNA-DNA-Hybridstrang synthetisieren und in einem zweiten Schritt den RNA-Anteil abbauen. Für die RT-PCR wurde die *SuperScript II Reverse Transkriptase* verwendet. Als *Primer* dient eine zum Poly (A)-Schwanz der mRNA komplementäre Oligo-Desoxythymidylat-Folge (Oligo-[dT]). Für die Messung der mRNA-Kopienzahlen wurden neben dem Oligo-[dT]-*Primer* Gen-spezifische, reverse *Primer* für die cDNA-Gewinnung verwendet. Für die Herstellung von cDNA für Sequenzierungen wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und für die quantitativen Analysen jeweils 1,5 µg Gesamt-RNA.

Tabelle 10: Pipettierschema für eine RT-PCR

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	1 µl dNTP (5 mM)	
2	1 µl Oligo-[dT] (25 pmol / µl)	
3	(0,5 µl genspez. <i>Primer</i>) (12,5 pmol / µl)	
4	1,5 / 5 µg RNA	
5	ad 10 µl DEPC-H ₂ O	Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur: Inkubation (5 min, 65 °C)
6	4 µl <i>First strand Buffer</i> (5 x)	
7	2 µl DTT (0,1 M) 1 µl <i>SuperScript II</i> (200 U) <i>Reverse Transcriptase</i>	Inkubation (50 min, 42 °C), Enzyminaktivierung (15 min, 70 °C)

2.2.4.5 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE)

Um das 3'-Ende von cDNAs zu ermitteln, wurde das *GeneRacer Core Kit* verwendet. Im Gegensatz zur herkömmlichen cDNA-Synthese verfügt hier der Oligo-[dT]₂₀ *Primer* über eine 36bp lange Verlängerung, die in der anschließenden PCR als *Primer*matrize für die unspezifischen 3'-RACE *Primer* dient. Das Prinzip des Umschreibevorgangs von RNA in cDNA wird in Abbildung 3 beschrieben. In einer ersten PCR wird nach der cDNA-Synthese, neben dem 3'-*Primer*, nur ein Gen-spezifischer *Primer* verwendet. Für die Erhöhung der Spezifität empfiehlt sich eine sogenannte „*nested*“-PCR (geschachtelte PCR), bei der neben einem zweiten Gen-spezifischen *Primer* der 3'-*Primer* verwendet wird. Beide *Primer* sollten an das erste Amplifikat binden.

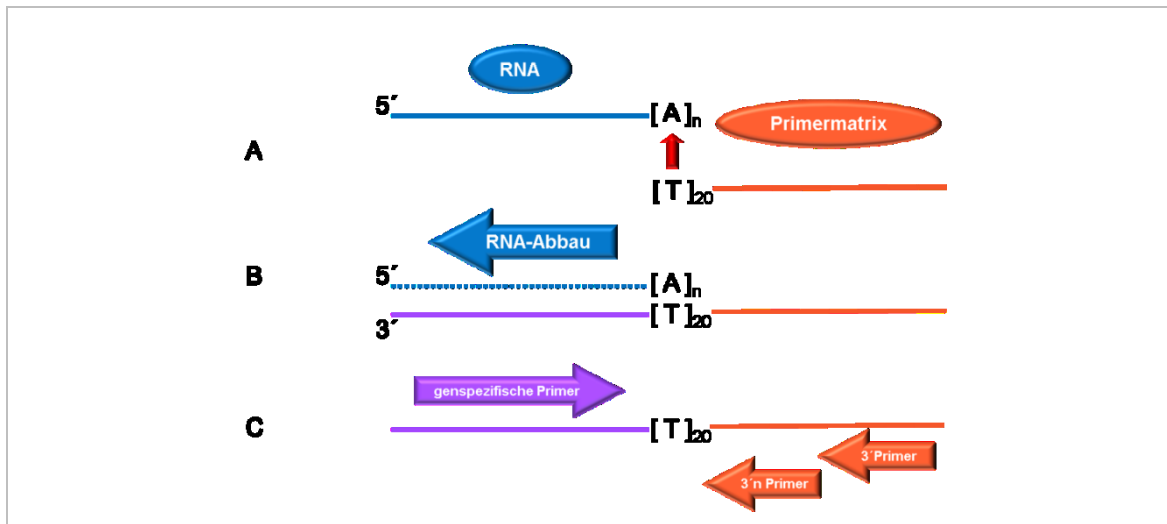


Abbildung 3: Prinzip der 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends

A) Reverse Transkription mit Annealing des Oligo-[dT]₂₀ Primer; B) Abbau der DNA; C) PCR mit Genspezifischen und 3'- bzw. 3'-n-Primer

2.2.4.6 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE)

Für die Ermittlung der 5'-Enden von cDNAs fand ebenfalls das *GeneRacer Core Kit* Verwendung.

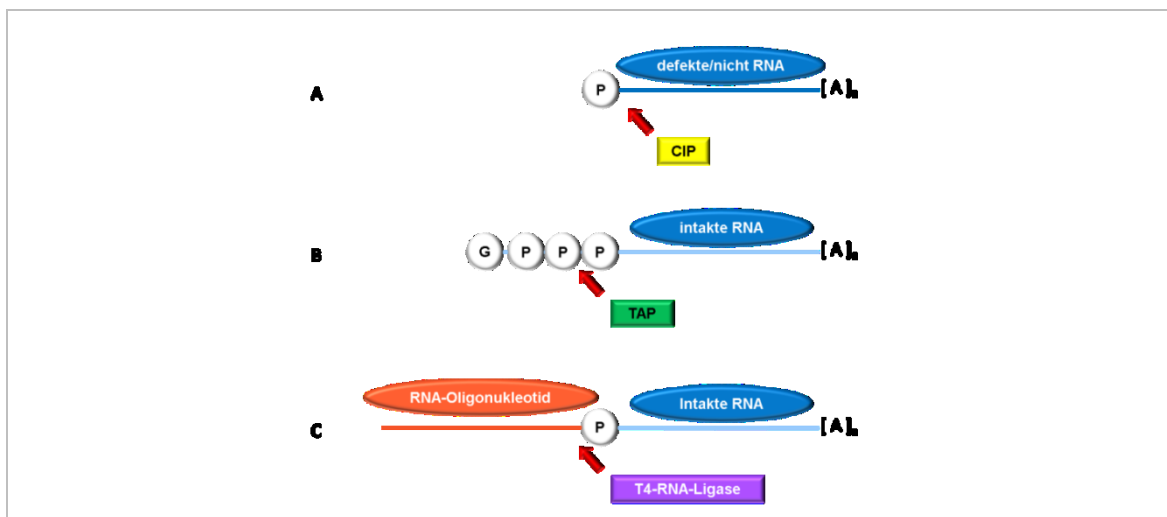


Abbildung 4: Prinzip der 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends

A) Dephosphorylierung der nicht-RNA bzw. der RNA ohne Kappenstruktur durch CIP (*Calf Intestine Phosphatase*); B) Entfernung der Kappenstruktur intakter RNA (Phosphatgruppe wird für die T4-RNA-Ligase zugänglich gemacht) durch *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP); C) Ligation des RNA-Oligonukleotids mit der T4-RNA-Ligase

Beim 5'-RACE wird das 5'-Ende der RNA mit einem RNA-Oligonukleotid, einem künstlichen Motiv, ligiert. Das Oligonukleotid wird nach der RT-PCR als

Primermatrize genutzt. Die Behandlung der RNA vor der reversen Transkription wird in Abbildung 4 beschrieben.

Die Durchführung des RACE-Experiments (Tabelle 11) wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Tabelle 11: Durchführung des 5'-RACE-Experiments

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	250 ng RNA 1 µl CIP-Puffer (10 x) 1 µl RNaseOut (40 U / µl) 1 µl CIP (10 U / µl) ad 10 µl DEPC- H ₂ O	Inkubation (1 h, 50 °C)
2	90 µl DEPC- H ₂ O 90 µl Phenol-Chloroform	Vortexen (30 sek), Zentrifugation (5 min, 14000 rpm), Überstand umpipettieren
3	2 µl <i>Mussel glycogen</i> 10 µl Natriumacetat (3 M) 220 µl Ethanol (95 %) 500 µl Ethanol (70 %)	Mischen kurz Vortexen, Herunterkühlen (15 min, -80 °C), Zentrifugation (20 min, 14000 rpm, 4 °C), Überstand verwerfen Mischen, Zentrifugation (20 min, 14000 rpm, 4 °C), Überstand verwerfen Pellet trocknen
4	7 µl DEPC- H ₂ O 1 µl TAP-Puffer (10 x) 1 µl RNaseOut (40 U / µl) 1 µl TAP (0,5 U / µl)	Inkubation (1 h, 50 °C)
5		Wiederholung Schritt 2 und 3
6	0,25 ng lyophilisierte <i>Gene Racer</i> - Oligos	Mischen (Pipette), anzentrifugieren Inkubation (5 min, 65 °C) auf Eis ruhen lassen (2 min)
7	1 µl Ligase-Puffer (10 x) 1 µl RNaseOut (40 U / µl) 1 µl ATP (10 mM) 1 µl T4 RNA-Ligase (5 U / µl)	Inkubation (1 h, 37 °C)
8		Wiederholung Schritt 2 und 3
9		cDNA-Synthese mit Gen spezifischen <i>Primern</i>

Anschließend an die RNA-Aufbereitung konnte das 5'-Ende unter Verwendung von Gen-spezifischen *antisense Primern* sowie den im Kit mitgelieferten 5'- und 5'n-*Primer* mittels „*nested*“-PCR aus der Gen-spezifisch umgeschriebenen cDNA isoliert werden.

2.2.4.7 Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR)

Die *Real-Time*-quantitative PCR ist eine sehr sensitive Methode, um die physiologische Aktivität von Zellen oder eines Gewebes zu beschreiben. Mit ihrer Hilfe ist es möglich,

die Anzahl von Transkripten zu quantifizieren. Das *LightCycler* 96 System kombiniert die Amplifikation von Oligonukleotiden mit fluorometrischen Messungen. Als Fluoreszenzmarker diente SYBR Green aus dem SensiFAST SYBR No-ROX Kit. Dieser Marker interkaliert während der PCR innerhalb jedes Zyklus in neu synthetisierte doppelsträngige DNA. Der DNA-Fluoreszenzmarker-Komplex absorbiert blaues Licht ($\lambda = 494 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda = 521 \text{ nm}$). Mit jedem PCR-Zyklus steigt die Kopienzahl und somit die Fluoreszenz. Nach dem Erreichen eines spezifischen Schwellenwertes (Ct-Wert) wachsen Kopienzahl und Fluoreszenz proportional an und sind ab diesem Zeitpunkt messbar. Eine Schmelzpunktanalyse erlaubt Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe und die Spezifität der gewählten *Primer*.

Um die Vergleichbarkeit der RNA-Proben untereinander zu gewährleisten, wurde in der reversen Transkription stets eine Konzentration von $1,5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA eingesetzt. Für eine Lightcycler-Messung wurden jeweils 5 % der umgeschriebenen RNA eingesetzt (Tabelle 12). Die cDNAs wurden nach der Herstellung eines Mastermix auf eine klare LightCycler®480 Multiwell Plate 96 pipettiert und mit LightCycler®480 Sealing Foil luftdicht verschlossen.

Tabelle 12: Pipettierschema für die RT-qPCR

Reagenz	Einsatz
H ₂ O _{bidest}	0,6 μl
SYBR® Green I Mastermix (2x)	6 μl
<i>forward-Primer</i> (25 pmol / μl)	0,2 μl
<i>reverse-Primer</i> (25 pmol / μl)	0,2 μl

Die RT-qPCR wurde nach folgenden Parametern programmiert:

Tabelle 13: RT-qPCR- Programm

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	-
Denaturierung	95	15 s	40
Primer-Annealing	60	10 s	
Elongation	72	20 s	
Messung der Fluoreszenz	75 ¹	5 s	
Erfassung der Schmelzkurve	65 - 95	15 s	
Reaktionsabbruch	37	30 s	

¹ Alle für die quantitativen Analysen abgeleiteten *Primer* amplifizieren Fragmente mit einer Schmelztemperatur um die 75 °C)

Die im Lightcycler getesteten Fragmente wurden einkloniert und durch Sequenzierung überprüft. Eine Verdünnungsreihe der klonierten Fragmente wurde für die Ermittlung einer Standardkurve verwendet. Weiterhin wurde eine 1×10^6 -Kopien beinhaltende Verdünnung in jeder Messreihe mitgeführt.

2.2.5 Isolation von genomischen Sequenzen mit Hilfe der *Genome Walker* Methode

Die *Genome Walker*TM-Methode ermöglicht die Isolation von DNA-Sequenzen stromaufwärts, wie auch stromabwärts, von bekannten DNA-Abschnitten. Im ersten Schritt wird DNA mit den selten schneidenden Restriktionsenzymen *EcoRV*, *DraI*, *PvuI*, *StuI* verdaut. Die Restriktionsenzyme schneiden *blunt-end*, was eine stumpfe Ligation mit dem *Genome Walker*TM-Adapter-Oligonukleotid ermöglicht.

Der Adapter dient als Matrix für zwei *Primer*, die in einer *nested-PCR* verwendet werden können. Der Adapter ligiert in 3'- und in 5'-Richtung an die DNA-Fragmente, so dass auch DNA-Sequenzen in beide Richtungen isoliert werden können.

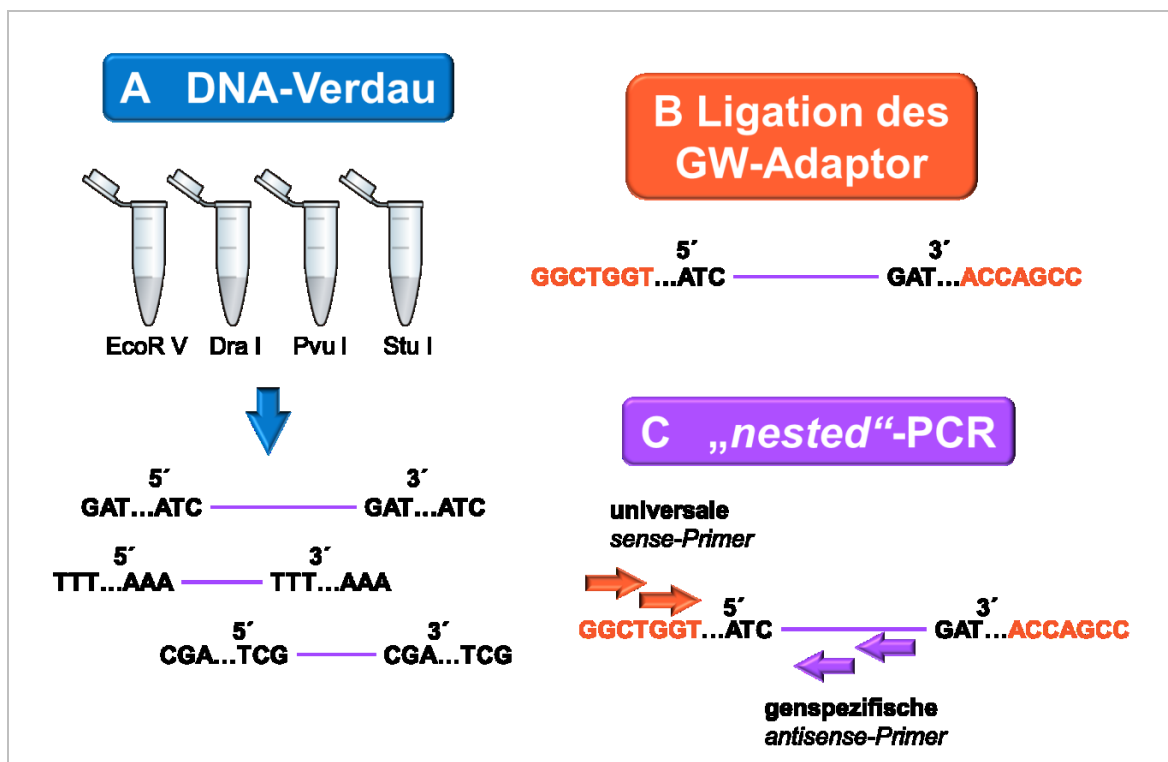


Abbildung 5: Schematische Darstellung der *Genome Walker*TM-Methode

A Für jedes Restriktionsenzym wird ein Ansatz hergestellt; B Die durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente werden in der Ligation mit dem *Genome Walker*TM-Adapter ligiert; C Zur Erhöhung der Spezifität wird eine *nested-PCR* durchgeführt. Dargestellt ist die Isolierung eines DNA-Abschnittes in 5'-Richtung.

Die *Genome Walker*TM-Methode wurde, wie in Tabelle 14 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 14: Ablauf der *Genome Walker*TM-Methode

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	12,5 µl genomische DNA (0,1 µg / µl)	Inkubation (37 °C, über Nacht)
	4 µl Restriktionsenzym je Ansatz (10 U / µl)	
	5 µl Restriktionspuffer (10 x)	
	28,5 µl H ₂ O _{dest}	
2	Phenol-Chloroform-Extraktion	
3	Ethanol-Natriumacetat-Fällung	
4	10 µl H ₂ O _{bidest}	Lösen des Pellets
5	4 µl verdaut, aufgereinigte DNA	Inkubation (16 °C, über Nacht); Reaktionstop (70 °C, 5 min)
	1,9 µl Genome Walker TM -Adapter (25 µM)	
	1,6 µl Ligase-Puffer (5 x)	
	0,5 µl T4-DNA-Ligase (6 U / µl)	
6	72 µl TE-Puffer	Auffüllen der Ligationsansätze
7	nested-PCR	

2.2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Längenbestimmung von Nukleotid-Fragmenten. Zu diesem Zweck wurden diese auf ein Agarosegel (Laufmatrix) gegeben und in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Nukleinsäuren sind auf Grund des deprotonierten Phosphatrestes im Molekül bei neutralem pH-Wert negativ geladen und wandern im Verlauf der Gelelektrophorese zur Anode. Die für die Laufmatrix verwendete polymerisierte Agarose bildet ein engmaschiges Netz, welches die Wanderung von Nukleotid-Fragmenten je nach Länge in unterschiedlicher Intensität hemmt. Die Mobilität der Moleküle im Gel verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Ein mitgeführter Längenstandard diente der Fragmentlängenbestimmung. Zur Visualisierung der Fragmente wird der Fluoreszenzmarker Ethidiumbromid der Laufmatrix beigemischt. Dieser interkaliert während der Elektrophorese in die große Grube der DNA-Helix und emittiert bei UV-Anregung langwelliges orangefarbenes Licht. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators und einer angeschlossenen Kamera können die aufgetrennten Nukleotid-Fragmente dann fotografisch dokumentiert werden.

Tabelle 15: Herstellung des Formaldehyd-Agarosegels (120ml)

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	1,44 g Agarose	vor der Zugabe von FA und MOPS aufkochen
2	86,54 ml DEPC-H ₂ O	
3	10,73 ml Formaldehyd (37 %)	
4	6 ml MOPS (10 x)	Gel gießen

Für den Nachweis von RNA wurden denaturierende Formaldehyd-Agarosegele (Tabelle 15) verwendet. Zur Auflösung der RNA-Sekundärstruktur wurde den RNA-Proben Formaldehyd und Formamid zugesetzt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Behandlung der RNA-Proben

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	1 µg RNA	
2	10 µl Formamid	
3	3,5 µl Formaldehyd (37 %)	
4	1 µl MOPS (10 x)	
5	2 µl RNA-Ladepuffer (10 x)	
6	0,1 µl Ethidiumbromid	Inkubation (5 min, 65 °C)

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung (Entfernung von überschüssigen Oligonukleotiden, dNTPs und Salzen) von PCR-Produkten für anschließende PCRs, Klonierung oder Sequenzierung wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* der Firma Roche verwendet.

Das PCR-Produkt wurde mit 100 µl Bindepuffer gemischt und auf eine Säule mit Fiberglasfleece gegeben. Zum Auffangen des Durchflusses wurde die Säule in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gestellt. Nach einem kurzen Zentrifugieren (20 s, 1400 rpm) folgten zwei Waschschrte. Im ersten Schritt wurden 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (20 s, 1400 rpm). Bindepuffer und Waschpuffer wurden verworfen. Für den zweiten Waschschrte wurden 200 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und es wurde eine Minute bei gleicher Drehzahl zentrifugiert. Das PCR-Produkt wurde mit H₂O_{bidest} und durch zentrifugieren (1 min, 14000 rpm) aus dem Fleece eliminiert.

2.2.8 Klonierung

Das Klonieren bietet die Möglichkeit, über PCR gewonnene DNA-Fragmente in großer Anzahl zu vervielfältigen und zu lagern. Sie besteht im Wesentlichen aus den drei Teilschritten Ligation, Transformation und Selektion. Bei der Ligation wird das Zielfragment in ein Plasmid eingebunden, bei der Transformation wird das ligierte Plasmid in kompetente Bakterienzellen geschleust und die Selektion ermöglicht darauf die Auswahl von Klonen mit dem gewünschten Produkt. Mit Hilfe von Expressionsplasmiden ist es außerdem möglich die cDNA-Sequenzen vollständiger

Faktoren zu klonieren, um diese nach Transfektion in eukaryotischen Zellen zu exprimieren.

2.2.8.1 Klonierung in pGEM-T *Easy Vector System I*

Der Vektor pGEM®-T *Easy* wird als lineares Molekül geliefert, an dessen Enden jeweils ein T-Nukleotid einzelsträngig hängt, sodass ausschließlich durch Taq-Polymerasen amplifizierte DNA-Fragmente mit Desoxyadenylat-Überhängen kloniert werden können. Die komplementären Basenpaarungen an den Enden der Moleküle erhöhen die Wahrscheinlichkeit für den Erfolg der Ligation. Die ATP-abhängige T4-Ligase (aus Phage-T4-infizierten *E. coli*-Zellen) katalysiert dabei die Entstehung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des einen und dem 5'-Phosphatende des anderen Fragments.

Tabelle 17: Durchführung der Ligation mit dem pGEM®-T *Easy Vector System I*

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	7,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt 0,5 µl pGEM®-T <i>Easy Vector</i> 1 µl T4-DNA-Ligase Puffer (10 x) 1 µl Ligase T4 (3 U / µl)	Der 10 µl- Ansatz wird über Nacht im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Für die Transformation wurden die ligierten DNA-Fragmente auf physikalischem Wege in kompetente Bakterienzellen geschleust. Bei den verwendeten Bakterien handelt es sich um XL1-Blue Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn 10 (Tet^r)]* -Zellen. Sie sind gentechnisch veränderte Derivate der Enterobakterien *E. coli* und wurden nach HANAHAN für die Transformation kompetent gemacht.

Tabelle 18: Durchführung der Transformation mit dem pGEM®-T *Easy Vector System I*

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
2	10 µl Ligationsansatz	Ablösen des Ligationskomplexes (5 min, 60 °C), abkühlen auf Eis
3	40 µl kompetente Zellen	Mischen, DNA-Bindung an die Bakterienmembran (30 sek, auf Eis), Inkorporation der DNA (90 sek, 42 °C)
4	160 µl SOC-Medium	Inkubation im Schüttelinkubator (1 h, 37 °C)
5		Ausplattierung des Ansatzes auf selektiven TY-Kulturagar (X-GAL, IPTG und Ampicillin), Inkubation (über Nacht, 37 °C)

Die über Nacht auf dem Kulturagar gewachsenen Zellkolonien mit dem gewünschten DNA-Fragment konnten darauf durch Blau-Weiß-Selektion von den Zellkolonien ohne Insert unterschieden werden.

Dies wurde durch die oben genannten Reagenzien IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; Aktivierung des lac-Operons) und X-GAL (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) gewährleistet. Der pGEM®-T *Easy*-Vektor verfügt dazu über den 5'-Abschnitt des lacZ-Gens, der den aminoterminalen Teil der β -Galactosidase codiert. Innerhalb dieses Gen-Abschnittes befindet sich die *multiple cloning site* (MCS), in welche die Ziel-DNA-Fragmente inseriert werden. Bei nicht erfolgreicher Ligation bleibt der 5'-Abschnitt des lacZ-Gens erhalten und der amino-terminalen Teil der β -Galactosidase exprimiert. Die verwendeten XL1-*Blue*-Zellen verfügen über den 3'-Abschnitt des lacZ-Gens. Der durch die Zellen exprimierte carboxy-terminale Teil des Enzyms bildet mit dem amino-terminalen Teil die funktionale β -Galactosidase. Dieses Enzym ist in der Lage, die β -galactosidische Bindung von X-GAL zu hydrolysieren. Nach Luftoxidation entsteht 5,5-Dibromo-4,4-dichloro-indigo und die Bakterienkolonien nehmen eine Blaufärbung an. Bei erfolgreicher Rekombination ist der 5'-Abschnitt des lacZ-Gens inaktiviert. Die Kolonien bleiben folglich weiß.

Eine Auswahl von vereinzelter Kolonien wurde in 1-ml-Kulturen über Nacht inkubiert. Mit Hilfe der sogenannten Mini-Plasmidpräparation wurde zunächst ausreichend DNA aufgereinigt, um eine Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Klone durchführen zu können.

Tabelle 19: Durchführung der Plasmidrestriktion für die Kontrolle der Klone

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	0,5 μ l Plasmid-DNA (aus Plasmidpräparation Mini) 1,5 μ l Enzym-spezifischer Puffer 0,5 μ l Restriktionsenzym ad 15 μ l H ₂ O _{dest}	Inkubation (37 °C, 1 h)

Der pGEM-T *Easy Vector* verfügt dazu über *EcoRI*-Enzymschnittstellen 5' beziehungsweise 3' der Desoxythymidylat-Enden. Ein Verdau mit diesen Enzymen sollte das Ziel-Fragment herauspalten. Der Nachweis erfolgte über Gelelektrophorese. Bei positivem Nachweis des Zielfragmentes wurde mit den Resten des 1ml-Inkubationsansatzes eine 100ml Kultur beimpft und erneut inkubiert (über Nacht, 37 °C). In der darauffolgenden Maxi-Plasmidpräparation wurde eine DNA-Menge isoliert die für Sequenzierung und für weiterführende Klonierungsversuche ausreicht.

Tabelle 20: Durchführung der Plasmidpräparationen

Schritt	Zugabe von:	Mini	Ablauf	Maxi	Ablauf
1	Lysat	in Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Zentrifugation (30 s, 14000 rpm), Überstand verwerfen	in falcon (2 x 50 ml)	Zentrifugation (10 min, 3750 rpm), Überstand verwerfen
2	TE-Puffer (kalt)			5 ml	Zentrifugation (10 min, 3750 rpm), Überstand verwerfen
3	Lösung I Lösung II Lösung III	100 µl 200 µl 150 µl	Pellet suspendieren vorsichtig mischen vortexen, Zentrifugation (10 min, 14000 rpm)	3,2 ml 6,4 ml 4,8 ml	Pellet suspendieren vorsichtig mischen vortexen, Zentrifugation (15 min, 3750 rpm)
4			Lösung umpipettieren (obere Proteinphase und Proteinpellet verwerfen)		Lösung durch sterilen Mull filtrieren
5	Isopropanol	450 µl	Kalt stellen (10 min, auf Eis)	1 Volumen	Kalt stellen (10 min, auf Eis)
6			Zentrifugation (10 min, 14000 rpm), Überstand verwerfen		Zentrifugation (15 min, 3750 rpm), Überstand verwerfen
7	Ethanol (70 %)	500 µl	Zentrifugation (5 min, 14000 rpm), Überstand verwerfen, Pellet trocknen	5 ml	Zentrifugation (10 min, 3750 rpm), Überstand verwerfen, Pellet trocknen
8		50 µl (H ₂ O _{dest})	Pellet lösen (Restriktions-analyse)	3,2 ml TE-Puffer	Pellet lösen
9	RNaseA (20 mg / µl)	0,1 µl	Inkubation (5 min, 37 °C)	8 µl	Inkubation (5 min, 37 °C)
10	RNase T1 (100000 U/ min)			0,5 µl	Inkubation (25 min, RT)
11	Proteinase K	0,2 µl	Inkubation (30 min, 37 °C)	5 µl	Inkubation (30 min, 37 °C)
12	Phenol-Chloroform-Extraktion				

2.2.8.2 Einfügen von Restriktionsenzym-Bindestellen

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die spezifische DNA-Motive erkennen und diese schneiden. Expressionsvektoren verfügen für die Ligation von DNA-Fragmenten über solche Erkennungs-Motive. Diese Bindestellen müssen vor der Klonierung in die DNA-Fragmente eingefügt werden. Dazu nutzten wir *Primer*, denen am 3'-Ende des Gen-spezifischen Motivs eine entsprechende Erkennungssequenz angehängt wurde. Diese wird durch das *Primer-Annealing* im ersten Zyklus der PCR an das DNA-Fragment angefügt und darauf weiter amplifiziert. In den Expressionsversuchen wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, die *sticky-ends* (klebrige Enden) produzierten. Die *Primer* für die Expressionsklonierungen sind im Anhang 2 tabellarisch gelistet.

2.2.8.3 Expressionsklonierung

Die TLR2-kodierende cDNA-Sequenz wurde im pFLAG-CMV-1 (Sigma Aldrich) exprimiert, die IRAK4-kodierende Sequenz in einem modifizierten *pBluescript KS Vector*- Expressionvektor (YANG *et al.*, 2008). Beide Faktoren wurden zusätzlich mit einem GFP (Grün fluoreszierendes Protein) -kodierenden Genfragment fusioniert. Das GFP-Fragment wurde aus dem Expressionsvektor pAM505 (Prof. G. Hobom, Universität Gießen) isoliert. In beiden Expressionsklonen wurde das GFP-Fragment am 3'-Ende des jeweiligen Faktors ligiert.

Zunächst wurde die *Template*-cDNA im pGEM-T *EasyVector* subkloniert. Darauf erfolgte eine erneute Amplifikation unter Verwendung von *Primern*, die entsprechende Restriktionsenzym-Bindestellen als Überhänge tragen. Erneutes Einklonieren in den pGEM-T *EasyVector* und Ausspalten mit den Restriktionsenzymen lieferte Fragmente mit den entsprechenden Überhängen.

Tabelle 21: Durchführung der Plasmidrestriktion für Expressionsklonierung

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	10 µg Plasmid-DNA (aus Plasmidpräparation Maxi) 35 µl Enzym-spezifischer Puffer 5 µl Restriktionsenzym ad 350 µl H ₂ O _{dest}	Inkubation (37 °C, über Nacht)

Diese wurden in die jeweiligen Expressionsvektoren eingefügt. Die Restriktionsprodukte wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und aus den Agarosegelen isoliert.

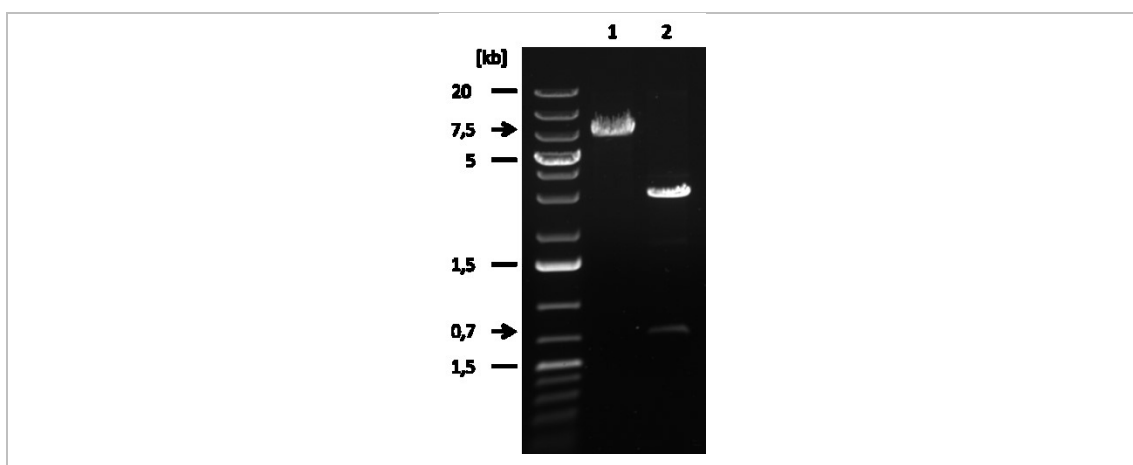


Abbildung 6: Beispiel für einen Restriktionsverdau

- 1) Das pFLAG-CMV-1-TLR2-Konstrukt wurde mit KpnI linearisiert.
- 2) Das im pGEM-T *Easy Vector* subklonierte GFP-Fragment (0,7 kb) wurde mit KpnI herausgespalten.

Die isolierten Fragmente werden mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt und es werden Konzentrationsbestimmungen durchgeführt.

Der Einsatz von Vektor und Insert für die Ligation wird durch folgende Formel berechnet.

$$\frac{ng_{Vektor} \times kb_{Insert}}{kb_{Vektor}} \times \frac{3}{1} = ng_{Insert}$$

Tabelle 22: Durchführung der Ligation bei der Expressionsklonierung

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	<ul style="list-style-type: none"> × µl aufgereinigtes PCR-Produkt × µl Expressionsvektor 1 µl T4-DNA-Ligase Puffer (10 x) 1 µl Ligase T4 (3 U / µl) ad H₂O_{bidest} 	Der 10 µl- Ansatz wird über Nacht im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Die anschließende Transformation wurde wie in Punkt 2.2.9.1 durchgeführt. Die genutzten Expressionsvektoren verfügen nicht über ein lac-Operon, so dass keine Blau-Weiß-Selektion möglich ist. Daher war es meist nötig eine höhere Zahl an Klonen zu kultivieren. Die selektierten Klone wurden anschließend in 80ml Kulturen vervielfältigt. Zum Einsatz in der Zellkultur muss die DNA endotoxinfrei aufgereinigt werden. Dies wurde durch die Verwendung des Endo Free Plasmid Maxi Kit (Quiagen) gewährleistet.

Tabelle 23: Durchführung der endotoxinfreien Plasmidpräparationen

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	2 x 40 ml Lysat	Zentrifugation in Ultrazentrifuge (15 min, 5455 rpm, 4 °C), Überstand werfen
2	5 ml Puffer P1-RNase	Pellet lösen (beide Lösungen vereinen)
3	10 ml Puffer P2	vorsichtig mischen
4	10 ml Puffer P3	Lösung durch sterilen Mull in die Filtersäule (dünner Filter) geben, Lösung mit Pumpe durch den Filter drücken und mit 50 ml Falcon auffangen
5	2,5 ml ER-Puffer	vorsichtig mischen, Lösung in die Filtersäule mit dicken Filter geben
6	10 ml QBT	Filter damit anfeuchten und Durchfluss werfen
7	30 ml QC-Puffer	Durchfluss werfen, Schritt wiederholen
8	15 ml QN-Puffer	Durchfluss in 50 ml Falcon auffangen
9	10,5 ml Isopropanol	Mischen, Zentrifugation (30 min, 8626 rpm, 4 °C), Überstand werfen
10	5 ml Ethanol (70 %) (aus dem Kit)	Zentrifugation (10 min, 8626 rpm, 4 °C), Überstand werfen, Pellet trocknen
11	50-100 µl H ₂ O (endotoxinfrei)	In 1,5 ml Reaktionsgefäß umpipettieren

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA nach SANGER beruht auf dem Basen-spezifischen Abbruch der Polymerase-Reaktion durch den Einbau von ddNTPs (Didesoxyribonucleosid-triphosphat). Diese Moleküle besitzen keine freien Hydroxygruppen für die Verknüpfung weiterer Phosphodiesterbindungen durch die DNA-Polymerase. Für den am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie verwendeten 3130 Genetic Analyzer wurden Reaktionsansätze mit einem Mix aus dNTPs und mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern ausgestatteten ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) verwendet. Die einzelsträngigen Kettenabbruchprodukte werden in einer Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt, die Fluoreszenz der ddNTPs angeregt, detektiert und von der mitgelieferten *Software* in eine Nukleotidsequenz übersetzt.

Die für die vorliegende Arbeit benötigten Sequenzierungen wurden im DNA-Sequenzierlabor des Bereichs Genombiologie von Frau Marlies Fuchs durchgeführt. Die klonierten Nukleotid-Fragmente wurden mit den auf pGEM®-T *Easy* bindenden Oligonukleotiden SP6 [5' TATTTAGGTGACACTATAG 3'] und T7 [5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'] sequenziert.

2.3 Zellkultur und Analysen von exprimierten Faktoren

2.3.1 Zellkultur der Zelllinie HEK293

Die HEK293 ist eine adhärent wachsende Epithelzelllinie. Sie ist das Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Abschnitten des humanen Adenovirus 5. Die Zellen exprimieren nicht TLR2 und TLR4 und zeichnen sich durch gute Wachstumsraten sowie eine gute Transfektionsfähigkeit aus. Dies machte sie zu einem etablierten Modell für funktionale Untersuchungen der TLRs sowie der TLR-Signalkaskade. Auch Fischfaktoren wurden bereits erfolgreich in dem Säugerzellsystem untersucht (REBL et al., 2010).

Die Zellen werden in Zellkulturschalen oder 6-well-Platten bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % (Brutschrank) kultiviert. Als Medium diente das HEK-Zellkulturmedium bestehend aus SIGMA EMEM, FKS (Fötales Kälberserum), L-Glutamin und NEAA (*Non-essential Amino acids*). Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang 2

gelistet. Für die Erneuerung des HEK-Mediums oder beim Splitten der Zellen wurde PBS in den Waschschritten verwendet.

2.3.2 Transfektion mit *Lipofectamine 2000*

Lipofectamine 2000 enthält Lipide, die in wässriger Umgebung Liposomen formen, welche das Transfektionsmaterial beinhalten können. Die DNA enthaltenden Liposomen sind an der Oberfläche positiv geladen, sodass sie mit der negativ geladenen Zellmembran fusionieren können und dabei ihre Fracht in die Zelle abgeben.

Für die Expressionsversuche wurden die HEK293 in 6well-Platten so ausgebracht, dass sie am Tag der Transfektion zu 65 % konfluent waren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 800 µl Sigma Medium (EMEM) ohne FKS bedeckt. Die im Versuch verwendeten DNA-Mengen wurden durch Auffüllen mit leerem Expressionsvektor konstant gehalten.

Tabelle 24: Durchführung der Transfektion mit *Lipofectamine 2000*

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
1	(1) Transfektionsansatz (100µl): DNA-Menge ad 100 µl Sigma Medium	DNA und Medium mischen
2	(2) <i>Lipofectamine</i>-Ansatz (100 µl): 94 µl Sigma Medium 6 µl <i>Lipofectamine 2000</i>	Ansatz mischen , Inkubation (5 min, RT)
3	Ansatz (1) und (2)	Ansatz mischen , Inkubation (20 min, RT)
4		Nach der Inkubation wird der gemischte Ansatz (200 µl) auf die HEK293 gegeben, Inkubation (3 h, 37 °C, 5 % CO ₂)
5	Doppelmedium: 0,2 ml FKS (20 %) Ad 1 ml Sigma Medium	Doppelmedium wird auf die Zellen geben, Inkubation (Dauer versuchsabhängig, 37 °C, 5 % CO ₂)

2.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Lokalisation der untersuchten Faktoren in der Zelle wurden ihre GFP-Fusionsproteine in der HEK293 exprimiert und mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM780 detektiert. Das Mikroskop ist mit einem 63-fachen Ölimmersions-Differentialinterferenzkontrast (DIC)- Objektiv und einer Inkubationskammer zur Gewährleistung der Kultivierungsbedingungen ausgestattet. Die Zellkerne der lebenden Zellen wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die mit dem Mikroskop gelieferte *Software*

ermöglichte die Vereinigung der Einzelbilder (DIC, Anregung von Hoechst 33342 sowie GFP).

2.3.4 SDS-PAGE

Die Expression der GFP-Fusionsproteine wurde neben dem Nachweis mittels Laser-Scanning-Mikroskopie zusätzlich mit einem Westernblot validiert. Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ermöglicht das Auftrennen von Proteinen nach ihrer Molekülmasse.

Nach der Transfektion in HEK293 (Tabelle 24) und einer anschließenden 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde den Zellen ein Volumen zweifach Laemmli-Probenpuffer hinzugefügt. Die dabei freigesetzte DNA führte zu einer hohen Viskosität der Lösung. Durch das Aufziehen der Lösungen in eine Injektionsspritze mit einer feinen Kanüle wurde die DNA mechanisch zerstört. Anschließend wurde die Lösung zur Denaturierung 3 min gekocht. Zur ungefähren Proteinbestimmung wurde darauf die optische Dicht am Nanodrop bestimmt. Die zwischenzeitlich vorbereiteten 10 %igen Mini-PROTEAN® TGX™ Gele wurden mit 10 µl der Lösung (50 µg Protein) je Tasche geladen. Als Standard für das Molekulargewicht wurde der ColorPlus *Prestained* Protein Marker mitgeführt. Es wurden stets zwei Gele mit denselben Proben beladen, von denen eins für eine Coomassie-Blaufärbung und das andere zum eigentlichen Blotting verwendet wurde. Nach dem Einspannen der Gele in die Mini-PROTEAN® Protein-Elektrophorese-Zelle wurde zum Auftrennen der einzelnen Proteine eine Spannung von 80 V für etwa 90 min angelegt.

Das blau gefärbte Gel (30 min in Coomassie-Blau) wurde mit SDS-Gelentfärber (2 h) entfärbt. Das Muster der gefärbten Banden validierte die Menge und Integrität der Proteine. Das Gel wurde fotografiert und zur Aufbewahrung mit Gelrockenpuffer in Blattcellophan konserviert (2 Tage, RT).

2.3.5 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörperreaktionen. Die Methode schließt die Übertragung der durch die SDS-PAGE

aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran sowie den eigentlichen Antikörpernachweis mit ein. Wir nutzten das Verfahren für den direkten Nachweis der Expression der GFP-Fusionsproteine in den HEK293. Die Proteinübertragung wurde mittels eines Druckblots gewährleistet. Als Primärantikörper diente der im Kaninchen angereicherte anti-GFP *rabbit IgG fraction* (#A-11122), als Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase (A3687). Die Kombination des Redoxfarbstoffes NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und des Substrates BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) ermöglichte die Detektion der Alkalischen Phosphatase.

Tabelle 25: Durchführung des Western Blot

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
Behandlung des Proteingels:		
1	Transferlösung + DTT	Inkubation (30 min, RT) in Plastikschaale schütteln
2		Glasplatte, Klarsichtfolie, 3 x Filtrierpapier Whatman (+ Transferlösung), Nitrocellulosemembran, Proteingel, Nitrocellulosemembran, 3 x Filtrierpapier Whatman (+ Transferlösung), Klarsichtfolie, Glasplatte, beschweren, Inkubation (über Nacht, RT)
Druckblot		
Behandlung der Membranen:		
3	Blockierlösung (WB)	Inkubation (1 h, RT) in Plastikschaale schütteln
4	Waschlösung (WB)	3 x waschen (10 min, RT) in Plastikschaale schütteln
Antikörperreaktion:		
5	Anti-GFP (100ng/ml) in Waschlösung (WB) 5ml	Inkubation (2 h, RT) in Folie eingeschweißt
6	Waschlösung (WB)	4 x waschen (10 min, RT) in Plastikschaale schütteln
7	Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase in 5 ml Waschlösung (WB)	Inkubation (2 h, RT) in Folie eingeschweißt
8	Waschlösung (WB)	4 x waschen (10 min, RT) in Plastikschaale schütteln
9	DETECIII	1 x waschen (2 min, RT) in Plastikschaale schütteln
10	44 µl NBT + 33 µl BCIP in 10ml DETECIII	Inkubation bis Proteinbande erscheint (>2 min, im Dunkeln)
11	TE-Puffer	Stoppen der Substratreaktion

2.3.6 Reporterogenanalyse

Die Arbeit mit Zellsystem und Transfektion bietet, neben der Darstellung der räumlichen Anordnung von Faktoren in der Zelle, die Möglichkeit Reportergenanalysen einzusetzen. Die Verwendung von ELAM (*endothelial-leukocyte adhesion molecule*) getriebenen NF- κ B-Reporterplasmiden ist ein etabliertes System zum Nachweis der Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors. Der ELAM-Promotor ist künstlich und verfügt über mehrere NF- κ B-Ansatzstellen. Die Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors leitet die Expression des Luciferase-Reportergens (isoliert aus der

Seefeder, *Renilla reniformis*) ein. In der Arbeit fand ein nach YANG *et al.*, 2008 modifiziertes Reporterengenkonstrukt Verwendung. In den Transfektionsansätzen wurden 50 ng des Reporterplasmids eingesetzt. Die HEK-293 Zellen waren nach Transfektion und Inkubation möglichst zu 95 % konfluent. Der Nachweis der Luciferase erfolgte mit Hilfe des Renilla Luciferase Assay Systems und dem Lumat³ LB9508 (Berthold Technologies). Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Gesamtproteingehalt der Probe normalisiert.

Tabelle 26: Durchführung des Luciferase Nachweis

Schritt	Zugabe von:	Ablauf
Zellyse:		
1	PBS	Zellen waschen
2	Luciferase Assay Lysis Puffer (minimales Volumen, 1 x)	Inkubation im Schüttelinkubator (15 min, RT), Zellysat in Reaktionsgefäß überführen
Substratreaktion:		
3	Luciferase Assay Substrate Luciferase Assay Puffer	Herstellung der Luciferase Assay Reagenz kurz vor den Messungen
4	Luciferase Assay Reagenz 100 µl	In die LB 9508 Lumat ³ Röhrchen vorlegen
5	Zellysat 20 µl	Vorsichtig durch Fingerschnippen mischen
6		Messung der Lumineszenz (10 sek)

2.3.7 Durchflusszytometrie

Peritonealzellen wurden mit der Durchflusszytometrie typisiert. Die Arbeiten dafür wurden von Köllner *et al.* am FLI Riems durchgeführt. Zunächst wurde der Peritonealraum mit 5 ml eiskaltem PBS (5 mM EDTA) gespült und die Zellsuspension wurde abgesaugt. Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl und für die Anteile von lymphoiden und myeloiden Zellen wurden 100 µl der Zellsuspension in 300 µl PBS (0,01 M EDTA) gelöst und mit dem FACSCalibur im „Hochdurchsatz“-Modus innerhalb von 20 sek gezählt. Die Diskriminierung der Zelltypen erfolgte durch die Verwendung Zelltyp-spezifischer Antikörper, wie bereits von der Arbeitsgruppe Köllner (KORYTÁŘ *et al.*, 2013) beschrieben. Die Zellsuspension wurde für 30 min mit den Antikörpern inkubiert. Nach dem Waschen (3 × 5 min mit PBS) wurden die gebundenen, Zelltyp-spezifischen Antikörper mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper nachgewiesen. Die Maus-spezifischen Sekundärantikörper waren entweder mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder RPE (R-phycoerythrin) markiert.

2.4 *In silico* Methoden

2.3.1 Software, Datenbanken, Online-tools

Tabelle 27: Verzeichnis der *Software*, Datenbanken, *Onlinetools*

Software, Datenbanken, Onlinetools	Anbieter/Internetadresse
BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
ClustalW2-Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Datenbank Ensemble	http://www.ensembl.org/index.html
Datenbank <i>Fishbase</i>	http://www.fishbase.org/search.php
Datenbank GRASP	http://web.uvic.ca/grasp/
Datenbank NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
DNA Sequence Reverse and Complement	http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna_sequence_reverse_complement.php
ExpASy-Translate Tool	http://web.expasy.org/translate/
ExpASy-ProtParam tool	http://web.expasy.org/protparam/
Datenbank GRASP	http://web.uvic.ca/grasp/
HGNC	http://www.genenames.org/
LightCycler®96 Software	Roche, Basel, CH
MEGA Version 5	http://www.megasoftware.net/
Mendeley Desktop Version 1.13.3	Elsevier Inc., New York, NY, USA
NetNGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NPS@: ClustalW multiple alignment	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index
Primer3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/
<i>Prediction of transmembrane helices</i>	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
Protein Molecular Weight	http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html
PyMOL	DeLano Scientific LLC
READSEQ Sequence Conversion	http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/
Sequenzablage	http://www.ebi.ac.uk/submission/
<i>Sequence Extractor</i>	http://www.bioinformatics.org/seqext/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
SNAP v1.1.1	http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html
SigmaPlot Version 11.0	Systat Software Inc, San Jose, CA, USA
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Windows®7 Professional (inklusive <i>Excel</i> , <i>Word</i> , <i>Powerpoint</i>)	Microsoft, Albuquerque, NM, USA

2.3.2 Erstellen von Stammbäumen mit Programm MEGA 5

Das Programm MEGA 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) verfügt über verschiedene Algorithmen zur phylogenetischen und molekularbiologischen Evolutionsanalyse. Für die Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Gen- und Aminosäuresequenzen wurde der *Neighbor-Joining*-Algorithmus gewählt. Dieser Algorithmus legt zum Vergleich der Sequenzen einen bifurcalen Stammbaum an,

sodass immer ein Taxon allen anderen nachgeordneten Taxa gegenübersteht. Zur Analyse der Trennschärfe der Sequenzen wurden 1000 Bootstrap-Replikate generiert.

2.3.3 Statistik und graphisches Darstellung

Für die statistische und graphische Auswertung wurde SigmaPlot Version 11.0 verwendet. Alle Expressionsdaten wurden einer *one-way* ANOVA (*analysis of variance*) - Varianzanalyse sowie dem Tukey-*Post-hoc*-Test unterzogen. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde mit Sternchen (* $p < 0,05$;-; ** $p < 0,01$;-; *** $p < 0,001$) markiert. Graphische Darstellungen wurden mit Microsoft PowerPoint 2010 arrangiert.

3. Ergebnisse

3.1 Strukturelle und funktionale Charakterisierung von Schlüsselfaktoren der TLR-Signalkaskade

3.1.1 Der TLR2-Faktor der Regenbogenforelle

3.1.1.1 TLR2-cDNA-Sequenz der Forelle

Für Transkripte eines großen Teils der Forellen-Gene liegen Referenzsequenzen (*expressed sequence tags*, EST; *Whole-genome shotgun contigs*, wgs; *Transcriptome Shotgun Assembly*, TSA) vor. Diese können zur Ableitung von *Primern* in Datenbanken (NCBI, ENSEMBL) genutzt werden. Von den 1,7 Mio. abgelegten Forellen-Nukleotidsequenzen fanden sich allerdings keine mit ausreichend hoher Sequenzübereinstimmung zu orthologen TLR2-Sequenzen.

Aus diesem Grund identifizierten wir mit Hilfe eines Sequenzvergleichs konservierte Bereiche in den TLR2-Aminosäuresequenzen von sieben Vertebraten Spezies. Für die ermittelten konservierten Bereiche wurden die TLR2-cDNA-Sequenzen von fünf Fischarten ebenfalls verglichen (Abbildung 7). Mit Hilfe dieses *Alignments* konnten dann degenerierte *Primer* abgeleitet werden (Positionsnummern der degenerierten Primer beziehen sich auch die TLR2-cDNA vom Dreistachligen Stichling, *Gasterosteus aculeatus*).

Zunächst wurde mit dem *forward*-(f)-*Primer* [TLR2_f1: 5' TCARGATGATGT GGGCGTGGCT 3' (Pos. 1862 bp bis 1883 bp)] und dem *reverse*-(r)- *Primer* [TLR2_r1: 5' GGTGKTGGAGCTCAKGAGYTTGC 3' (Pos. 2327 bp bis 2349 bp)] eine *Touch-down*-PCR durchgeführt. Diese PCR ergab kein spezifisches Produkt (Abbildung 8A). Das PCR-Produkt der ersten PCR diente als Grundlage für eine zweite PCR. Diese sogenannte *nested*-PCR wurde mit *Primern* [TLR2_f2: 5' GACGCCTTYGKTCSTACAGC 3' (Pos. 1951 bp bis Pos. 1971 bp)] und [TLR2_r2: 5' CAGYTTGCAGAAACGCTKGGG 3' (Pos. 2305 bp bis Pos. 2325 bp)] durchgeführt, die stromabwärts der flankierenden *Primer* TLR2_f1 beziehungsweise TLR2_r1 liegen. Diese sogenannten *nested Primer* wurden nach dem gleichen Prinzip der flankierenden *Primer* abgeleitet (Abbildung 8). Mit diesen *Primern* wurde in der

Touch-down-PCR ein 333 bp langes Fragment amplifiziert, welches hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen Fisch-*TLR2*-Genen aufwies (Abbildung 8B). Zur Ermittlung des 3'-Endes der *TLR2*-cDNA diente dieses Fragment (Pos. 2098 bp bis Pos. 2430 bp auf HE979560) zur Ableitung von f-*Primern* für die 3'-RACE-Experimente [*TLR2_f3*: 5' CGCCTTGTGTCGTACAGCGA 3' (Pos. 2100 bp bis Pos. 2120 bp); *TLR2_f4*: 5' TGGTTCCAGAGCTGGAGGATTC 3' (Pos. 2150 bp bis Pos. 2171 bp); beide HE979560]. Unterstrichene Basensymbole stehen für Unterschiede zwischen *Primersequenz* und letztendlich ermittelter nativer Sequenz.

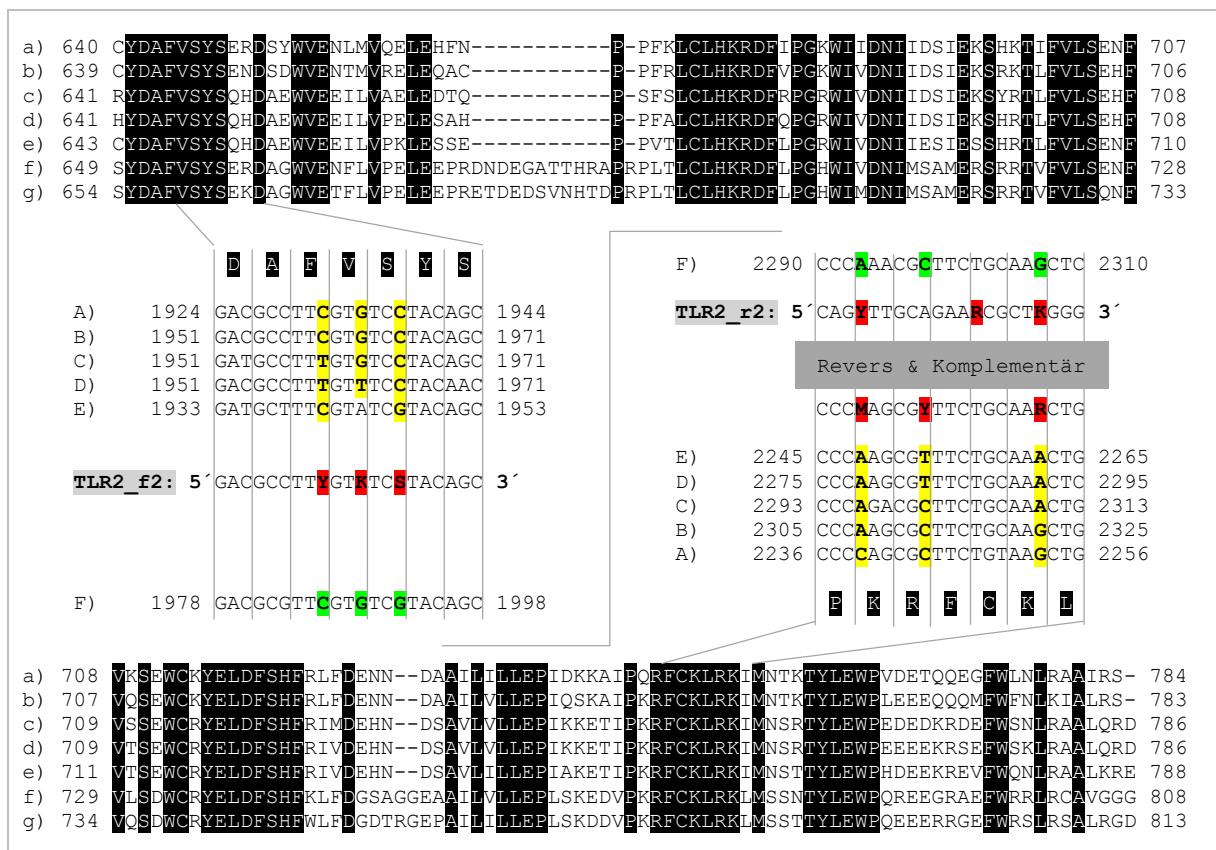


Abbildung 7: Ableitung der degenerierten Primer für das erste Forellen-*TLR2*-Fragments

Für das Aminosäure-Alignment wurden die TIR-Domänen-Sequenzen folgender Spezies verwendet: a) *Bos taurus*; b) *Taeniopygia guttata*; c) *Danio rerio*; d) *Cyprinus carpio*; e) *Ictalurus punctatus*; e) *G. aculeatus*; f) *Paralichthys olivaceus*. Die weißen und schwarz unterlegten Aminosäurereste sind in allen verwendeten Spezies homolog.

Für das Alignment der Nukleotidsequenzen wurden die Sequenzen folgender Spezies verwendet: A) *B.taurus*; B) *G.aculeatus*; C) *Takifugu rubripes*; D) *Oryzias latipes*; E) *I.punctata*; F) *Oncorhynchus mykiss*.

Alle verwendeten Sequenzen sind im Anhang 3 mit Referenznummern gelistet. Die Positionsnummern der cDNA-Sequenzen beziehen sich auf das Startcodon. Gelb unterlegt sind die Nukleotide, die zwischen den Arten unterschiedlich sind. An diesen Positionen wurden im *Primerdesign* alternative Basensymbole (*Ambiguity Code*; rot unterlegt) eingefügt, die für die unterschiedlichen Nukleotide stehen (Y = C oder T; K = G oder T; S = G oder C; M = A oder C; R = A oder G). Grün markiert sind die Nukleotide, die tatsächlich in unserer Forellen-*TLR2*-Sequenz gefunden wurden.

Für die Aufklärung des 5'-Endes mussten erneut Sequenzvergleiche für die Ableitung degenerierter f-*Primer* durchgeführt werden. Die *TLR2*-cDNA-Sequenz des Falschen

Heilbutts (*Paralichthys olivaceus*, [AB109393](#)) wurde diesmal als Referenzsequenz verwendet.

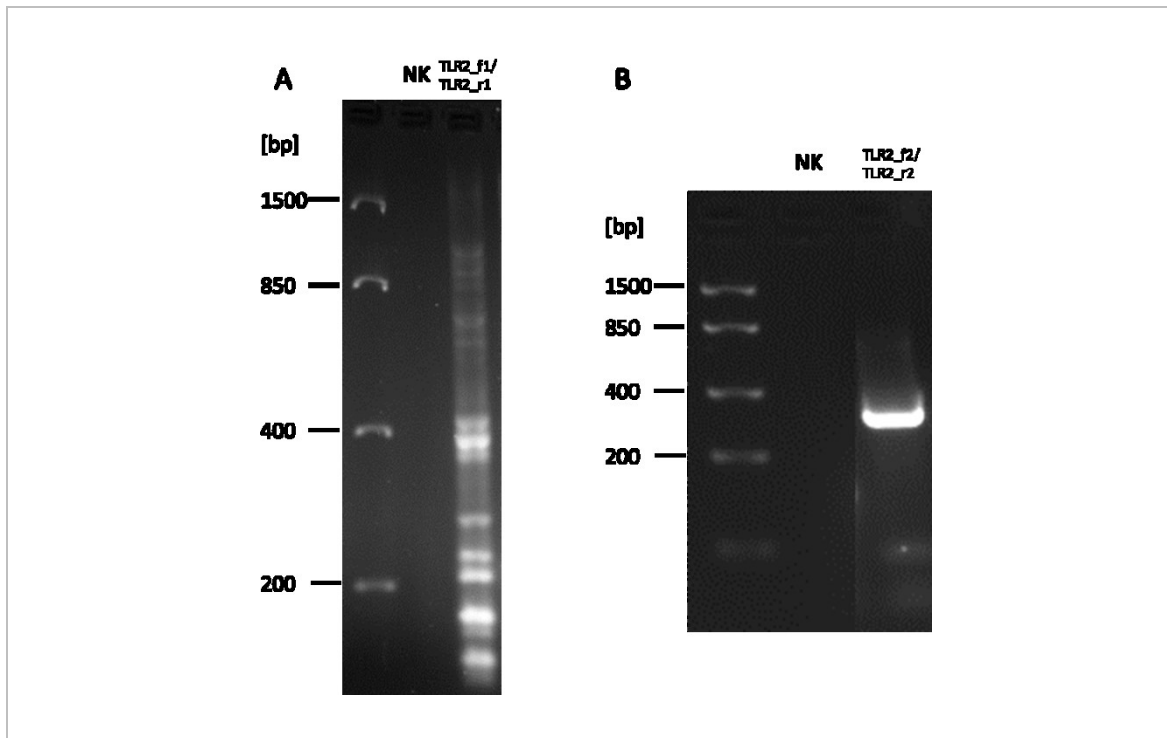


Abbildung 8: Elektrophoretische Darstellung der ersten TLR2-cDNA-Fragmente

A Erste PCR mit den *Primern* TLR2_f1/TLR2_r1; B Zweite PCR mit den *nested Primern* TLR2_f1/TLR2_r2; NK = Negativkontrolle

Mit den *Primern* [TLR2_f5 5' GGAGGTCCKGCTCTGGAGG 3' (Pos. 601 bp bis Pos. 619 bp); TLR2_r3: 5' GCGTCTTGCTCGCTGTACGA 3' (Pos. 2110 bp bis Pos. 2129 bp)] konnte bei herabgesetzter Annealing-Temperatur (58 °C) ein 1503 bp großes Fragment amplifiziert werden.

Mit der neu erhaltenen Sequenzinformation konnten nun r-*Primer* für das 5'-RACE-Experiment abgeleitet werden. Mit den *Primern* [TLR2_r4 5' GTCATGGATGATAGAGGAGACGA 3' (Pos. 779 bp bis Pos. 801 bp); TLR2_r5: 5' CCTGGAATGGTCCTCGGAGA 3' (Pos. 747 bp bis Pos. 766 bp)] wurde ein 691 bp großes Fragment gewonnen, mit dem die Gesamt-TLR2-cDNA zusammengesetzt werden konnte. Der Leserahmen der TLR2-cDNA wurde zur Bestätigung der Sequenz im Gesamten amplifiziert und kloniert. Hierfür wurden die *Primer* [TLR2_f6 5' CATCTCCTGGTTACATCAGGTC 3' (Pos. 21 bp bis Pos. 42 bp); TLR2_r6: 5' GAATTCAGACTACCCGGAAC 3' (Pos. 2551 bp bis Pos. 2571 bp) ; beide [HE979560](#)] eingesetzt.

Die ermittelte TLR2-cDNA-Sequenz hat eine Länge von 2690 bp und umfasst einen offenen Leserahmen von 2421 bp. Der 5'-UTR (*untranslated region*) ist > 120 bp lang.

Als Stoppsignal dient ein [TGA]-Codon, an das sich nach 67 bp ein nicht-kanonisches Polyadenylierungssignal [AGTAAA] anschließt. Der Poly(A)-Schwanz folgt 16 bp stromabwärts mit einer Länge von 60 bp. Somit umfasst der 3'-UTR 149 bp.

Aus der konzeptionellen Translation (ExPASy *Translate tool*) des offenen Leserahmens der TLR2-cDNA leitet sich ein Protein mit 806 Aminosäureresten ab. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 92,3 kDA, der isoelektrische Punkt liegt bei 6,5.

a)	V P E L E D S Q P P L T L C L H K R D F L P	
b)	TGGTTCCAGAGCTGGAGGATTCCCAGCCTCCGCTCACCTCTGCCTCCACAAGAGAGACTTCCTGCCAG-----	069
c)	:::GTGATT	076
d)	* * * * *	
a)		
b)	-----	069
c)	GATTTAATCCCATGACTTATTCCCAAGGTTCTTCCCACTCTTCTTACCTAGCTTAGCTAGCTTGTTTCATGTTTTC	152
d)		
a)		
b)	-----	069
c)	TGCCTTGCTTTTATATTGTTTGGACTTGTTGAACCGTCTCGTTAGGATTCTTTGAAAGGAGGTTAAATGAATG	228
d)		
a)	G H W I I D N I I H A M E R S R R	
b)	-----GCCACTGGATCATCGACAACATTATCCATGCAATGGAACGCAGTCGACGCA	120
c)	CATTTTGTTAAATGTATTCTTTAG: ::	304
d)		
a)	T L F V L S E H F V H S E W C R Y E L D F S H F R L	
b)	CCCTCTTCGTCCTGTGAGAACTTCCTCCATTCTGAGTGGTGGCGGTACGAGTTGGACTTTTCCCACTTCCGTCT	196
c)	::GTTTCATTCTGCCCTGTCTCACTAC	380
d)		
a)	F D G D S E A A V L V L L E P I S K D D V P K R F	
b)	GTTTGACGGGACTCAGAGCGGCGTCTGGTGTCTTGGAAACCATCTCCAAGGACGACGTTCCCAAACGCTTC	272
c)	TACGCAGAATGGACGGTTAAAGTATTTCAGCTGTCAACATTCATTCATTAAGAACAACATCTAAGCATCAAAAA	456
d)		
a)	C K L R K L M S S R T Y L E W P Q E D E R R A E F	
b)	TGCAAGCTCCGCAAGTTGATGAGCTCCCGTACCTACCTGGAGTGGCCGAGGAGGACGAGAGGAGGGCAGAATTCT	348
c)	AA-----	524
d)		
a)	W N N L R L A V R G G D E L	
b)	GGAACAACCTCCGTCTGGCCGTGAGGGGCGGAGATGAGCTGTGAATCCAACCGGTTCCGGGTAGTCTGGAATTCCA	424
c)	-----	524
d)		
a)		
b)	GAAATATTCTCAGAATTATTATATTTCTGCCGACAGTAAAGATTGATGAGTTGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	500
c)	-----	524
d)		
a)		
b)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	541
c)	-----	524
d)		

Abbildung 9: Alignment der 3'RACE-Sequenzen

Doppelpunkte stehen für Sequenzidentität der Nukleotide, Sternchen für Sequenzidentität der Aminosäuren. Die Aminosäuren stehen über der zweiten Base des jeweiligen Triplets. Die fett gedruckten Basensymbole markieren potentielle Spleißgrenzen. Stopcodons sind in Kästchen dargestellt. a) Aminosäuresequenz für den TLR2a-cDNA 3'RACE; b) 3'RACE der TLR2a-cDNA; c) Das alternative 3'-Ende (TLR2b-Transkriptvariante X1; [LK933547](#)) resultiert theoretisch in einem vorzeitigem Abbruch der Translation. d) theoretische Aminosäuresequenz der TLR2b-Transkriptvariante X1

Aus dem 3'-RACE mit den *Primern* TLR2_f3 und TLR2_f4 ergab sich durch ein alternatives 3'-Ende außerdem der Hinweis auf ein zweites *TLR2*-Gen (Abbildung 9. und 10). Im Vergleich mit der bereits beschriebenen TLR2-Variante verfügt das alternative 3'-Ende über einen 184 bp langen Einschub, der ein vorzeitiges Stoppsignal [TGA] in die Sequenz einführt. Stromaufwärts (Pos. 2150 bp bis Pos. 2157 bp auf HE979560) sowie stromabwärts (Pos. 2219 bp bis Pos. 2320 bp auf HE979560) von dem Einschub sind die Sequenzen beider Varianten gleich. In Richtung 3'-Ende zeigte sich nach Base 2320 weder eine Homologie zur TLR2a-cDNA der Forelle, noch zu orthologen Genen irgendeiner anderen Art. Der theoretische 3'-UTR ist insgesamt 450 bp lang und verfügt 354 bp stromabwärts über ein nicht-kanonisches Polyadenylierungssignal [ATTAAA]. Der Poly(A)-Schwanz folgt 18 bp stromabwärts mit einer Länge von 73 bp. Der in Abbildung 9 gezeigte Einschub des alternativen 3'-Endes verfügt über potenzielle Spleißgrenzen [GT...AG], die charakteristisch für die Struktur von Introns sind. Ob wirklich unterschiedliche *TLR2*-Gene vorliegen, sollte mit der Ermittlung der Genstruktur geklärt werden.

3.1.1.2 *TLR2*-Gen der Forelle

Für die Ermittlung der *TLR2*-Genstruktur nutzten wir zunächst die *Primer* TLR2_f6 und TLR2_r6 (Anhang 2.1), die schon für die Amplifikation des gesamten TLR2-Leserahmens Verwendung fanden. Mit genomischer DNA als *Template* erhielten wir ein 2551 bp langes Fragment mit einer Sequenz, die zu 99,8 % mit der TLR2-cDNA übereinstimmt. Der Leserahmen des gesamten *TLR2*-Gens der Forelle ist demnach monoexonisch codiert (Abbildung 10). Bei den orthologen *TLR2*-Genen in Mensch, Haushuhn und Krallenfrosch wird zumindest der offene Leserahmen ohne Introns codiert. Für andere Fischarten wurden monoexonische (*D. rerio*), aber auch polyexonische (*P. olivaceus*) *TLR2*-Gene beschrieben. Für die Validierung der *TLR2* Gensequenz und aufgrund der Hinweise auf eine weitere *TLR2*-Genvariante in den RACE-Experimenten (3.1.1.1) wendeten wir die „*Genome Walker Methode*“ an, um das kodierende Gen zu isolieren. Mit einem *Primer*, der vom monoexonischen TLR2 abgeleitet wurde, erhielten wir die partielle Sequenz eines Introns. Im weiteren Verlauf der Suche wählten wir die „*Primer walking*-Strategie“, um die Genstruktur stromabwärts sowie auch stromaufwärts aufzuklären. Die *Primer* wurden von der

monoexonischen Variante oder von Introns abgeleitet. Die Ermittlung der DNA-Sequenz dieser Variante wird im Detail im Anhang 3.2 besprochen.

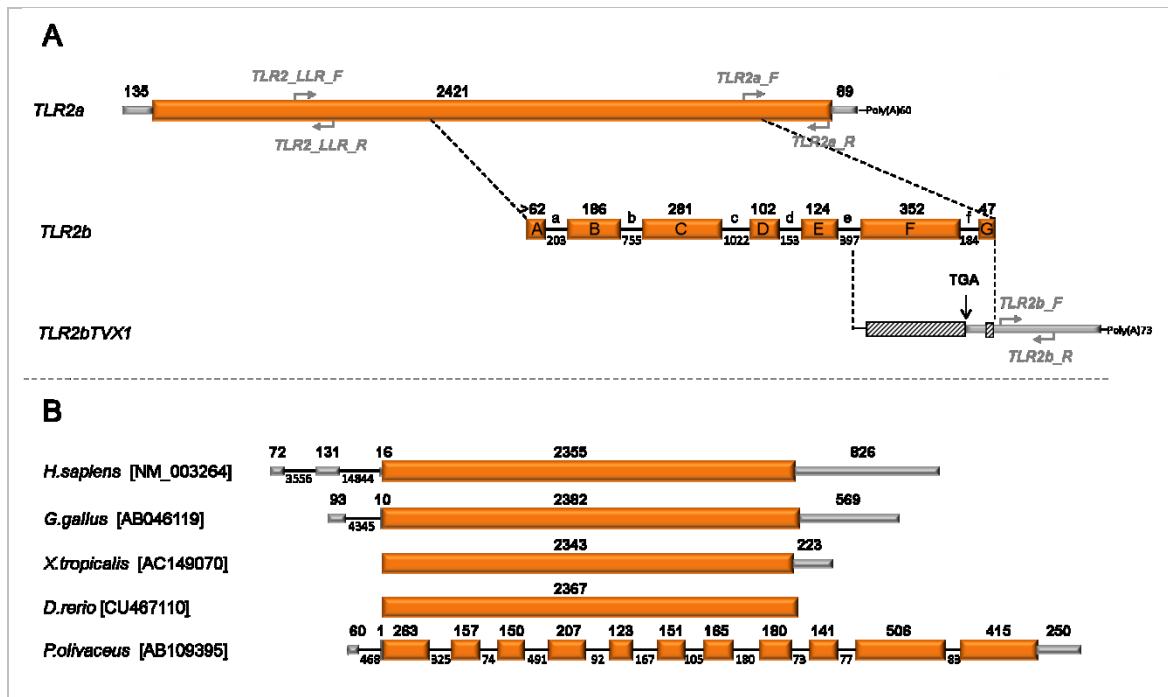


Abbildung 10: Genstruktur der *TLR2*-Gene

Die Exons (Balken) sind skaliert, die Introns (Linie) nicht. Der Protein-kodierenden Bereich des Gens (OLR) ist orange gestaltet. Die nicht Protein-kodierenden Bereiche der mRNA im 5'- und 3'- Bereich (*UTRs*) sowie die wahrscheinlich nicht translatierte TLR2b TVX1 sind grau gehalten. Die Zahlen auf den Balken und an den schwarzen Linien stehen für die Länge des Abschnitts [bp]. Die Pfeile markieren die Positionen der in der RT-qPCR eingesetzten, zwischen den Genen diskriminierenden *Primer* (grauer Schrift). Die im Vergleich verwendeten DNA-Sequenzen sind mit den Referenznummern im Anhang gelistet. A) Die Exon-/Intron-Segmentierung der TLR2 Gene der Regenbogenforelle; die quergestreifte Box zeigt, dass TLR2b TVX1 Sequenzhomologien mit dem *TLR2b*-Gen aufweist, aber nicht gespleißt wird. Großbuchstaben nummerieren die Exons, Kleinbuchstaben die Introns. B) Vergleich der *TLR2*-Genstruktur ausgewählter Vertebraten.

Es ergab sich eine 3868 bp lange Sequenz, die große Homologie mit der TLR2b-Transkriptvariante X1 aufwies. Insgesamt konnten wir fünf Introns finden, die den mRNA-kodierenden Bereich in sechs Exons teilen. Stromaufwärts von Nukleotid-Position 1112 (HE979560) liegen noch keine Sequenzinformationen vor.

Der Vergleich der TLR2a-cDNA-Sequenz mit der des monoexonischen *TLR2a*-Gens erbrachte 99,8 % Übereinstimmung der DNA-Sequenz. Beim Vergleich von *TLR2a* mit dem konzeptionell gespleißten polyexonischen *TLR2b* waren es 99,5 % Sequenz-Übereinstimmungen. Die *TLR2b*-Transkriptvariante X1 verfügt über Sequenzübereinstimmungen mit beiden *TLR2* Genen. Die Sequenzen an den Positionen 2150 bp bis 2218 bp und 2219 bp bis 2265 bp der TLR2a-cDNA gleichen den Sequenzen der Positionen 531 bp bis 600 bp beziehungsweise 783 bp bis 886 bp. Beim Vergleich der TLR2b zeigten sich in der TLR2b TVX1 Homologien mit dem Introns e

und f sowie mit den Exons F und G. Durch die *intron retention* wird in der Transkriptvariante direkt nach der [GT]-Spleißgrenze ein [TGA]-Stopcodon eingefügt und damit der Leserahmen beendet. Hinweise auf eine konservierte Exon-/Intron-Segmentation des *TLR2b* der Regenbogenforelle im Vergleich mit polyexonischen TLR2-Genen anderer Vertebraten konnten nicht gefunden werden.

3.1.1.3 Funktionale Gliederung des TLR2a-Faktors der Regenbogenforelle

Die konzeptionell translatierte TLR2a-Aminosäuresequenz wurde mit dem *Onlinetool* SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) auf ihre Funktionsdomänen untersucht (Abbildung 11A). Der TLR2-Faktor der Regenbogenforelle zeigte eine funktionale Gliederung wie sie auch für andere TLRs beschrieben ist. Er besteht aus einer C-terminalen TIR-Domäne einer Transmembrandomäne sowie einer N-terminalen Ektodomäne mit zehn LRRs.

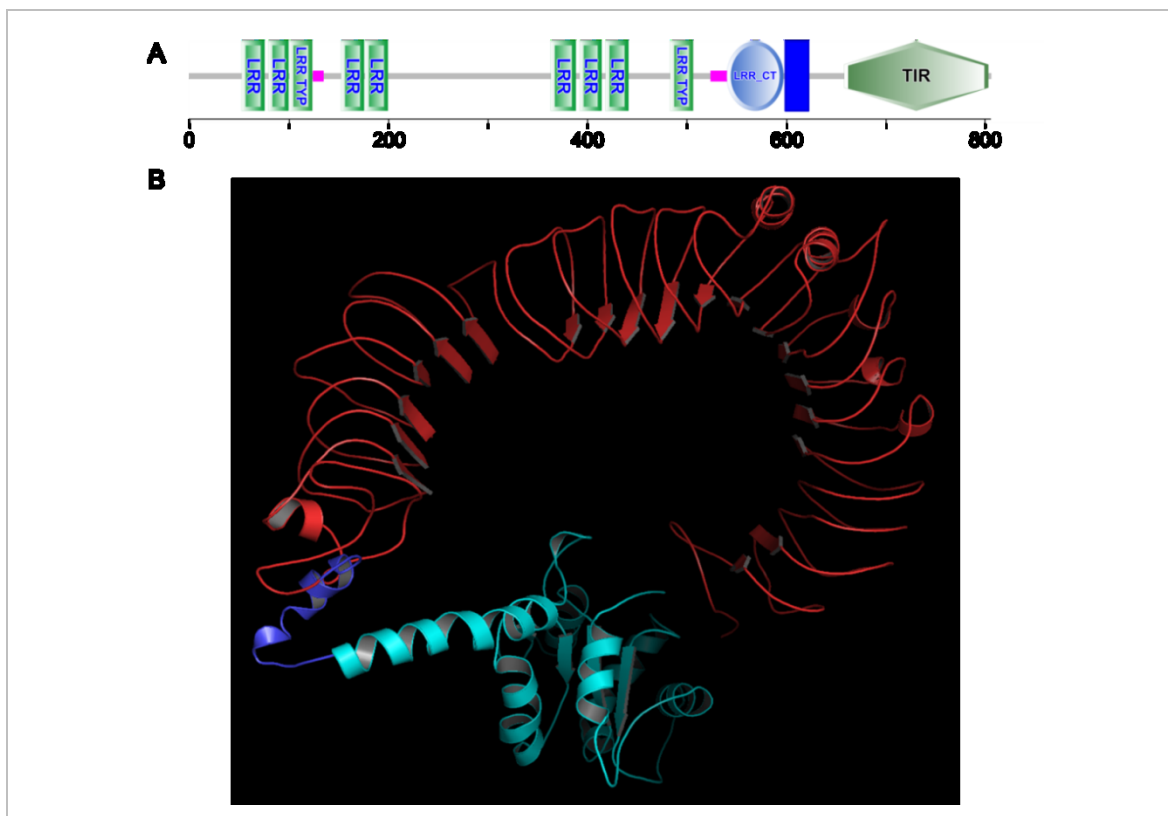


Abbildung 11: Funktionale Gliederung und 3D-Modell des TLR2a-Faktors der Regenbogenforelle
 A) Die funktionale Gliederung wurde mit dem *Onlinetool* SMART ermittelt. Es zeigt die charakteristischen LRRs, die Transmembrandomäne (blau) und die TIR-Domäne.
 B) Das 3D-Modell wurde mit dem *Onlinetool* PHYRE2 *Protein Fold Recognition Server* erstellt. Die Proteindomänen wurden mit der Software PyMOL farbig gestaltet. Die intrazelluläre TIR-Domäne wurde hellgrün, die Transmembrandomäne blau und die extrazelluläre LRR-Region rot markiert.

Im 3D-Modell zeigte die Ektodomäne eine Hufeisen-förmig angeordnete Struktur. Die TIR-Domäne des Forellen-TLR2 war kompakt und kugelförmig organisiert.

Die TLR2a-Aminosäuresequenz wurde weiterhin genutzt, um sie mit den TLR2-Aminosäuresequenzen von Mensch, Haushuhn, Krallenfrosch, Zebraäbrbling und Falschem Heilbutt zu vergleichen (Anhang 3.1). Es zeigten sich bei 21,5 % der Positionen die gleichen Aminosäurereste. An 17,5 % der Positionen fanden sich Aminosäuren mit hoher chemischer Äquivalenz, an 7 % schwache chemische Äquivalenz.

Der TLR2a-Faktor hatte im Einzelvergleich der Aminosäuresequenzen einen ähnlichen Konservierungsgrad zum TLR2-Faktor aller anderen Arten. Bei den Vertretern der Säuger, Vögel und Amphibien stimmen in etwa 40 % der Aminosäurereste des TLR2-Proteins überein. Bei den piscinen Vertretern waren es 50 bis 55 % (Tabelle 28).

Tabelle 28: Identitätenvergleich im Verhältnis zum Forellen-TLR2 in %

	Aminosäuresequenz (A)				cDNA-Sequenz (B)			
	Gesamt	LRR	Membran	TIR	Gesamt	LRR	Membran	TIR
<i>H.sap</i>	40,7	34,9	26,1	65,5	55,1	51,1	50,7	68,3
<i>G.gal</i>	39,0	32,7	26,1	63,5	56,9	53,4	58,0	69,0
<i>X.tro</i>	40,7	34,8	13,0	65,1	55,1	52,4	38,2	66,2
<i>D.rer</i>	49,6	46,2	30,4	70,6	59,8	56,3	49,3	72,6
<i>P.oli</i>	55,1	50,1	52,2	79,5	66,1	63,5	60,9	79,2

A) Die Aminosäuresequenzen (siehe Anhang) von *O. mykiss*; *H. sapiens*; *G. gallus*; *X. tropicalis*; *D. rerio* und *P. olivaceus* wurden mit dem *Onlinetool* NPS@: ClustalW aligniert. Die Positionen der Proteindomänen wurde von der humanen TLR2-Aminosäuresequenz abgeleitet: Extrazelluläre Domäne Pos. M1 - R578; Membrandomäne Pos T588 - H610; TIR-Domäne Pos. C640 - S784

B) Die offenen Leserahmen der cDNA-Sequenzen (siehe Anhang) der entsprechenden Spezies wurden mit dem *Onlinetool* ClustalW2-Alignment aligniert. Die Positionen der Proteindomänen-kodierenden Bereich wurde von der humanen TLR2-cDNA-Sequenz abgeleitet: Extrazelluläre Domäne Pos. 213 bp – 1973 bp; Membrandomäne Pos. 1974 bp – 2042 bp; TIR-Domäne Pos. 2130 bp – 2564 bp)

Weiterhin zeigte der Sequenzvergleich, dass in einigen Bereichen des Proteins der Anteil der Übereinstimmungen höher ist. In den TLR2-Proteinen aller im Vergleich verwendeten Arten (Tabelle 28) waren im Bereich der TIR-Domäne (Position C658 bis Position G803 des Forellen-TLR2) 46,4 % Aminosäurereste identisch, in der Membrandomänen (Position T588 bis H610) keine. In der Ektodomäne (Leucin-reiche Region Position M1 bis R578) waren lediglich 16,1 % der Aminosäuren identisch. Beim Vergleich der Aminosäure-Sequenzidentitäten der einzelnen Domänen mit den entsprechenden Bereichen auf der cDNA zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz der

extrazellulären Domäne weniger konserviert ist als ihre cDNA-Sequenz. Dies ist ein Hinweis auf eine positive Selektion. Die intrazelluläre TIR-Domäne wird bei gleichem Konservierungsgrad von Aminosäure- und cDNA-Sequenz negativ selektiert.

3.1.1.4 Konservierungsgrad entscheidender Aminosäurereste

Der Vergleich des TLR2 von Säuger und Regenbogenforelle (Abbildung 12) zeigte, dass das Bindemotiv (L106 bis L114) für Lipoproteine in beiden Spezies konserviert ist. Das Bindemotiv für Peptidoglykan (PGN) ist weniger konserviert. Die Aminosäurereste, die für posttranslationale Modifikationen verantwortlich sind, sind dagegen kaum konserviert. Nur eins der vier Glykosylierungsmotive des humanen TLR-Faktors ist auch bei der Regenbogenforelle zu finden. Der Sequenzbereich H318 bis K404 (humanes TLR2), in dem die essenziellen Aminosäurereste für die Dimerisierung des Rezeptors liegen, ist im Vergleich zu dem entsprechenden Bereich des Forellen-TLR2 nur zu 25% konserviert.

a)	MGSLAMLVLLFFSQGQSSTPEVEKRSTCDQCDELFQNCSSRNRYRHVPTVTVTVEVVTLDSLFDITSVAEDDLREY	076
b)	-MPHTLWMVWVLGVII LSK ESSNQASLS RNGI KG GSLNSI SGLTEA KS N R YISNS QRC	075
a)	TWLRTLDLHSNRIESIHEWAFHLLQGLESIDSYNQIAANPAWFSKLLSLQHLNLLGSCYRTLPGPGTSLFRSL	152
b)	VN QA V T G NT E DS SS GS H YSNSSS KP S TF NP K ---ET SH	148
a)	TRLRFLRFGNP-ALEEVRGDLGVRQLDQLEVYGNLKRYPGSLGDLWPLGVVTLRLRGPFQDNTLVSSIIHD	227
b)	K QI V MDTFTKIQ K F LTF EE IDASD QS EPK KSIQNVSHLI HMK----QHI LLE FV	219
a)	VSYSSETFLVVADVLLSEKTSVAPFRETNRRRVRSIMFQNALTLTDEAIVHFMEVMDGAS-LEFLGVEDATFHGTGSW	302
b)	TS VEC ELR TD DTFHFSELSTGETNSLIKKFT R VKI SLFQV KLLNQI G LE EFD C LN V NF	295
a)	TP---ARRTHLDNLDTVYFRNIEVMNVYKFTSFLPVGFLKLNLRQISIIICKVYVMECLTSLLLTQMVYLDLSGN	375
b)	RASDND VIDPGKVE LTI RLHIFRF L YDLSTLYS TERVKR TVEIS FLV L QH KSLE E	371
a)	LTDLTLTESLCHGIGILRNLRVINVS DNALKSISLISKLVTRLDKLVHLDISQNAYTSMPTCSWPQILTHINLSR	452
b)	MVEEY KN A EDA--WPS QTLILRQ H A LKGTGETLLT KN TNI K SFH E Q EKMKY S	445
a)	AKLRRVTPCLPPTLEILDIGHNDLTAFHVSVALPALRELHLSGNKLSLPPGWLFPSSLKVLLIQSNTLNMFGLDLQ	528
b)	TRHS GCI K VSN N NL S-LN Q K YI R T DAS L M L K SR AITT SKEQ D	520
a)	LYRRLRALQAGQNRFCVCSCEFVNFMVWRWGGAVEGSVELTDRWDNYLCDSPLPLQGQVRDVRQLSPFQCHRIILLVS	604
b)	SFHT KT E G N I LS TQEQQ----ALAKV I WPA SHVR Q QD R VSE TA	592
a)	SLCGCMLASGILFVILLWKIHAVYVRMMWAWLKAKRNSGNQKRDAAGNAYLLCYDAFVSYSQDAEWVEEFLVP	680
b)	GM CALFLLIL TGV CHRF GL MK Q KPRKAPS N-----R Y NLM Q	661
↓		
a)	ELEDSPPLTLCLHKRDLPLPGHWIIDNIIHAMERSRRTLVSEHFVHSEWCERYELDFSHFRLFDGDSEAAVLVLL	756
b)	NFN FK I KW DSI K HK V N K K ENND I I	737
a)	EPISKDDVPKRFCRLKLMSSRTYLEWPPQEDERRAEFWNNLRRLAVRGDEL	806
b)	E KAI I NTK MDEAQ EG V A IKS----	784

Abbildung 12: Alignment der TLR2 Aminosäuresequenzen von Regenbogenforelle und Mensch

Die hellgrau unterlegten Aminosäurereste gehören zum Signalpeptid. Das PGN-bindende Motiv ist unterstrichen. Die dunkelgrau unterlegten weißen Buchstaben markieren die Bindestellen für diacetylierte Lipoproteine. Boxen mit durchgezogener Linie markieren Glykosylierungsmotive. Bei der Regenbogenforelle wurden diese mit dem NetNGlyc 1.0 Server vorhergesagt. Die schwarz unterlegten Aminosäurereste sind für die Dimerisierung des TLR2 mit TLR1 beziehungsweise TLR6 verantwortlich. Die Box mit der gestrichelten Linie zeigt die Transmembrandomäne, die Box mit der gepunkteten Linie die TIR-Domäne. Der Pfeil markiert einen essenziellen As-Rest, der für *Knockout*-Versuche geeignet ist.

3.1.1.5 Phylogenetischer Vergleich der TLR2-Aminosäuresequenzen

Der Stammbaum in Abbildung 13 zeigt die Nähe der Verwandtschaft des Forellen-TLR2a zu den TLR2-Faktoren anderer Spezies. Der Stammbaum der TLR2-Aminosäuresequenzen stimmt mit der allgemein anerkannten Entwicklungsgeschichte im Tierreich überein.

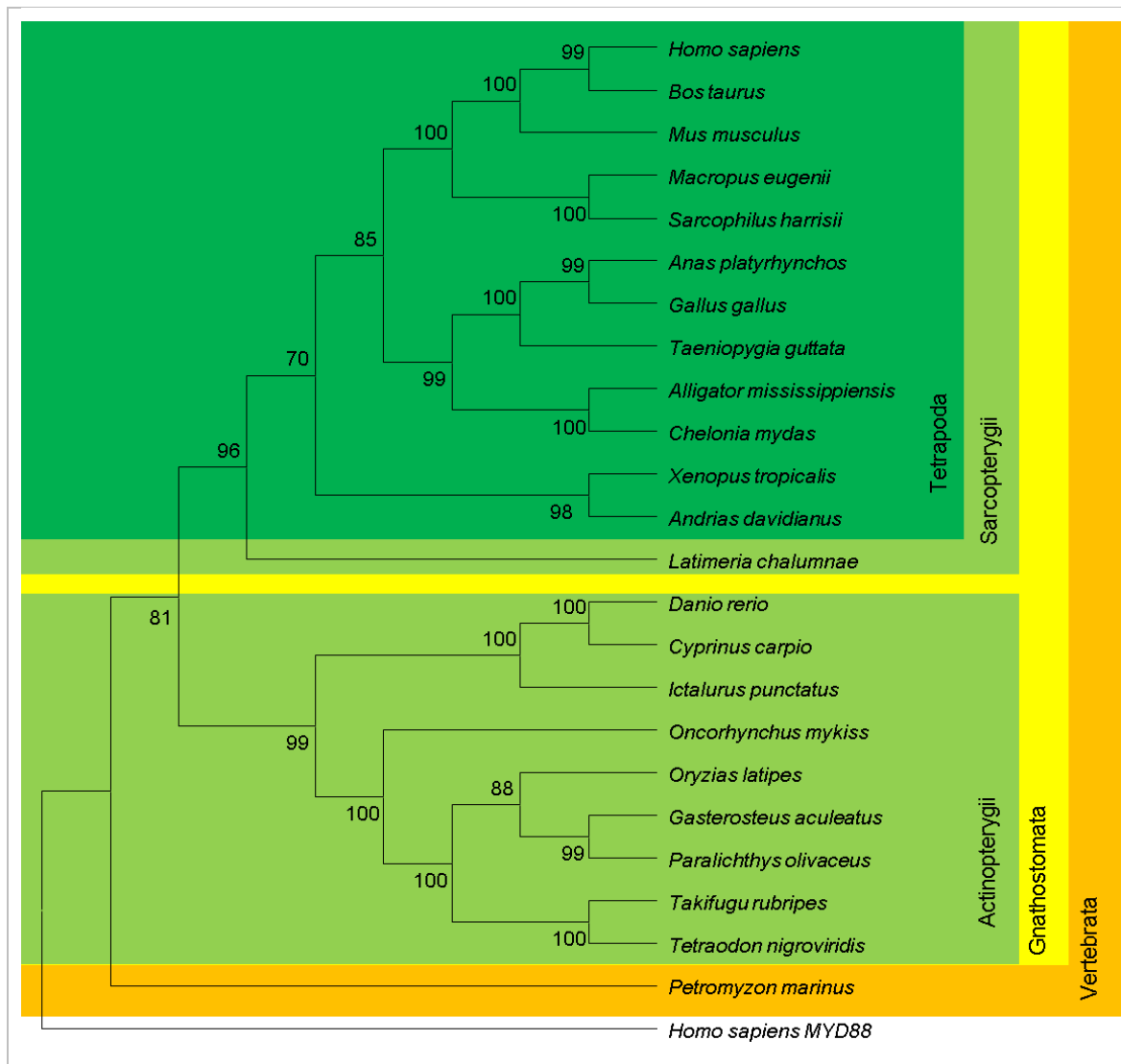


Abbildung 13: Phylogenetischer Vergleich der TLR2-Aminosäuresequenzen

Die Bootstrap-Werte an den Abzweigungen basieren auf 10000 Replikate und sind ein Maß für die Trennschärfe der verschiedenen TLR2 Faktoren. Als Außengruppe dient der humane TIR-Domänen-Adapter MYD88. Die im *Alignment* verwendeten Aminosäuresequenzen sind mit den Referenznummern im Anhang gelistet.

Der TLR2-Faktor des fischähnlichen basalen Wirbeltieres Meerneunaugen (*Petromyzon marinus*) steht allen Vertretern der Kiefermäuler (Gnathostomata) gegenüber. Weiterhin trennen sich im Stammbaum die Arten in Strahlenflosser (Actinopterygii) und Fleischflosser (Sarcopterygii). Innerhalb der Strahlenflosser bilden die TLR2-Faktoren

der Fische eine Gruppe. Der TLR2 des fischähnlichen, zu den Sarcopterygii zählenden, Quastenflossers (*Latimeria chalumnae*) zeigt mehr Ähnlichkeit mit den TLR2-Faktoren von Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern, welche sich ebenfalls jeweils zusammen gruppieren.

3.1.1.6 Gewebe-spezifische Expression des *TLR2* der Forelle

Für die Quantifizierung der TLR2-mRNA-Konzentration wurden zunächst *Primer* von der LRR-Region des Volle-Länge-TLR2 abgeleitet [TLR2_LCf: 5' GGAGAGGAGAC CTGGCTGGA 3' (Pos. 626 bp bis 645 bp); TLR2_LCr: 5' CCTGGAATGGTCCTC GGAGA 3' (Pos. 747 bp bis 766 bp), beide [HE979560](#)]. In dieser Region ist die Diversität unter den TLRs am Größten, so dass das Risiko für falsch positive Ergebnisse infolge von *mispriming* am geringsten ist. Dieses *Primer*paar wurde neben den Gewebe-spezifischen Analysen auch für die Untersuchungen im Infektionsversuch genutzt. Die später entdeckte TLR2b-Transkriptvariante X1 veranlasste uns diskriminierende *Primer* für die entdeckten Varianten abzuleiten. Die beiden *Primer*paare [TLR2a_LCf: 5' GCCAGGCCACTGGATCATCGA 3' (Pos. 2214 bp bis 2234 bp); TLR2a_LCr: 5' GAACGTCGTCCTTGGAGATGG 3' (Pos. 2390 bp bis 2410 bp), beide [HE979560](#)], sowie [TLR2b_LCf: 5' CTTGTTGAACCGTCTCGTTAGG 3' (Pos. 179 bp bis 200 bp); TLR2b_LCr: 5' ACAGGGCAGAATGAAACCGTAC 3' (Pos. 352 bp bis 373 bp), beide [LK933547](#)] wurden, diagnostisch für beide Varianten, anhand der 3' Region der Gene abgeleitet.

Wie in den Methoden beschrieben, wurden die zu messenden Fragmente in einen Vektor kloniert. Dieser wurde zur Bestimmung der Eichgeraden verwendet und als externer Standard in jedem *Lightcycler*-Lauf parallel bestimmt. Die Verwendung eines gemeinsamen Referenzstandards (Sequenz im Anhang 2.8) für alle drei Messbereiche gewährleistete eine sichere Bestimmung der jeweiligen relativen Anteile der Transkripte an der Gesamtmenge der TLR2-Transkripte.

Tabelle 29: ct-Werte der Standards von TLR2 (LRR), TLR2a und TLR2b TVX1

ct-Wert:	10 ⁶ Kopien	10 ⁵ Kopien	10 ⁴ Kopien	10 ³ Kopien
TLR2 (LRR)	14,6	18,3	21,9	25,6
TLR2a	12,5	16,4	19,9	23,4
TLR2b TVX1	13,5	16,8	20,4	23,8

Für die Standardbestimmung wurden weiterhin die Kopienzahlen aller Varianten von nur einer Verdünnungsreihe ermittelt (Tabelle 29).

Im Gewebevergleich zeigte sich, dass TLR2 am stärksten in der Milz, moderat in Kopfniere und Thymus und schwächer in der Leber exprimiert ist (Abbildung 14A). Innerhalb der Zelltypen zeigten sich tendenziell höhere TLR2-mRNA-Abundanzen in B-Lymphozyten und Monozyten beziehungsweise Makrophagen. Auch in Thrombozyten wird der TLR2-Faktor exprimiert (Abbildung 13B).

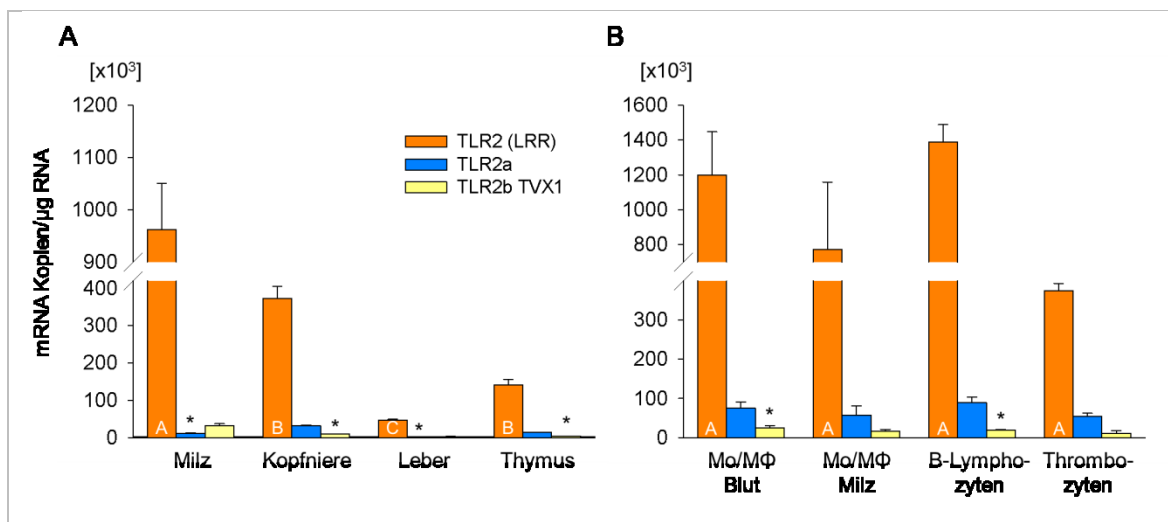


Abbildung 14: Gewebe-spezifische Expression des TLR2 und der TLR2-Varianten

Die mRNA-Kopienzahlen wurden von $n = 5$ Fischen bestimmt.

A) Von den Geweben Milz, Kopfniere, Leber und Thymus (Abszisse) wurden 1,5 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet.

B) Von den Zelltypen Monozyten und Makrophagen (aus Blut und Milzgewebe isoliert), B-Lymphozyten und Thrombozyten (Abszisse) waren es 50 ng RNA.

Die getrennte Darstellung von Geweben und Zelltypen resultiert aus den Unterschieden der eingesetzten RNA-Mengen und den unterschiedlichen Fehlern bei der Berechnung der mRNA-Kopienzahl / µg RNA (Ordinate). Die Fehlerbalken stellen den SEM dar, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Geweben und Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede der TLR2-Varianten im Vergleich mit dem TLR2 (LRR)-Fragment ($p < 0,05$).

Beim Vergleich von TLR2 (LRR) und TLR2a beziehungsweise TLR2b zeigt sich, dass letztere in der Summe im Mittel etwa 9% des TLR2 (LRR) ausmachten. TLR2a war in Milz und Leber signifikant niedriger exprimiert als TLR2 (LRR). In Kopfniere, Thymus, Monozyten beziehungsweise Makrophagen des Blutes und in B-Lymphozyten war die TLR2b TVX1 signifikant niedriger exprimiert. Interessanterweise fanden wir eine beachtliche Menge TLR2-mRNA (370000 ± 19000 Kopien / µg RNA) in den, bei Säugern kernlosen, Thrombozyten.

3.1.1.7 Funktionale Analysen zum Forellen-TLR2 im HEK293 Zellmodell

Die strukturellen und evolutionären Analysen geben einen Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des TLR2-Faktors der Forelle. Für den experimentellen Nachweis der Funktionalität, beziehungsweise der Ligandenspezifität, exprimierten wir den TLR2-Faktor in einem Zellmodell. Für den Expressionsnachweis wurde der Forellen-TLR2 zunächst mit einem C-terminal angehängten GFP-Faktor kloniert. Im Zellextrakt ließ sich die Expression des fusionierten Faktors mit einem GFP-spezifischen Antikörper im Westernblot nachweisen (Abbildung 15A).

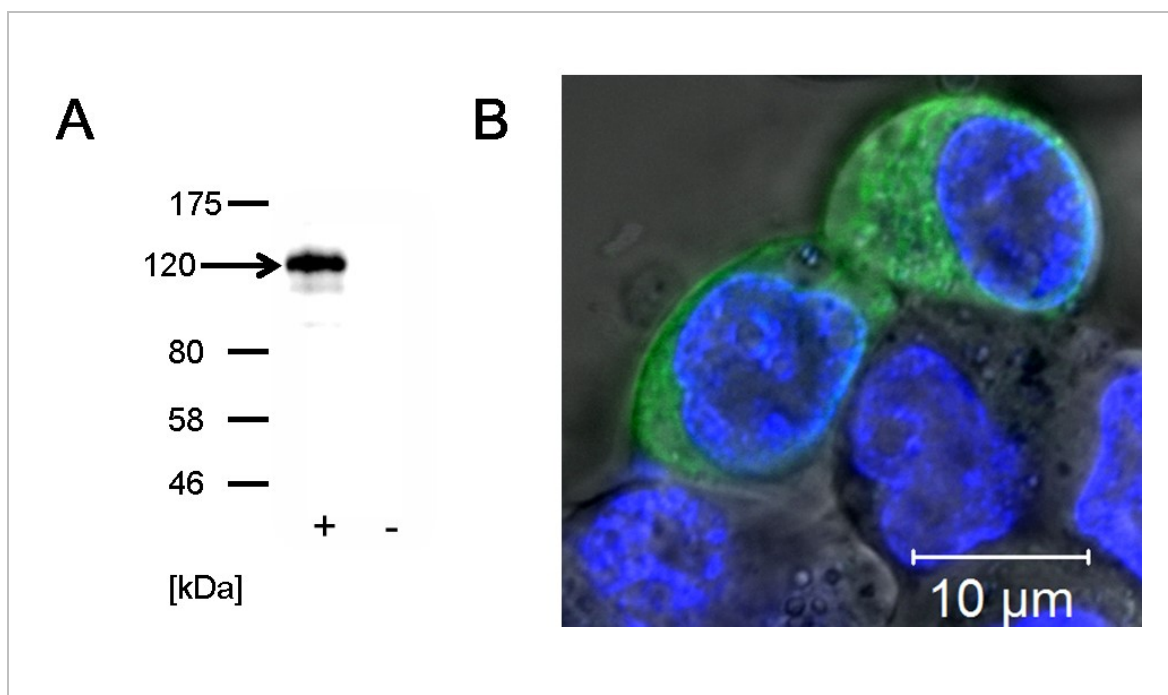


Abbildung 15: Nachweis der Expression des TLR2-GFP-Konstruktes

A) Westernblot mit einem GFP-Antikörper von einem Zellextrakt aus HEK293-Zellen 24 h nach Transfektion mit dem Forellen-TLR2-GFP-Expressionsplasmid.

B) Das Forellen-TLR2-GFP wurde analog zu A) in der HEK293 exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (1 µg/ml) markiert.

Das Konstrukt aus Forellen-TLR2 und GFP kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 121,3 kDa. Die Expression des TLR2-GFP-Proteins konnte außerdem mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 15B). Das Protein war cytosolisch, nicht jedoch im Zellkern lokalisiert. Eine ausschließliche Lokalisation in der Zellmembran konnte nicht beobachtet werden. Für die Ermittlung der Liganden des Forellen-TLR2 nutzten wir Reporteranalysen, um die Aktivierung der TLR-Signalkaskade der HEK293-Zellen anhand der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu messen. Als Referenz transfizierten wir parallel zu

den Forellen-TLR2-Konstrukten (mit und ohne GFP) immer einen Expressionsvektor für den bovinen TLR2-Faktor. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der bovine Faktor die Signalkaskade aktiviert und dass ein parallel transfizierter mutierter TLR2 (*knockout* der TIR-Domäne) diese Induktion mit steigender Konzentration zunehmend hemmt (Anhang 3.3). Darüber hinaus wurden für den Versuch Liganden ausgewählt, die bekanntermaßen den Säuger-TLR2 aktivieren.

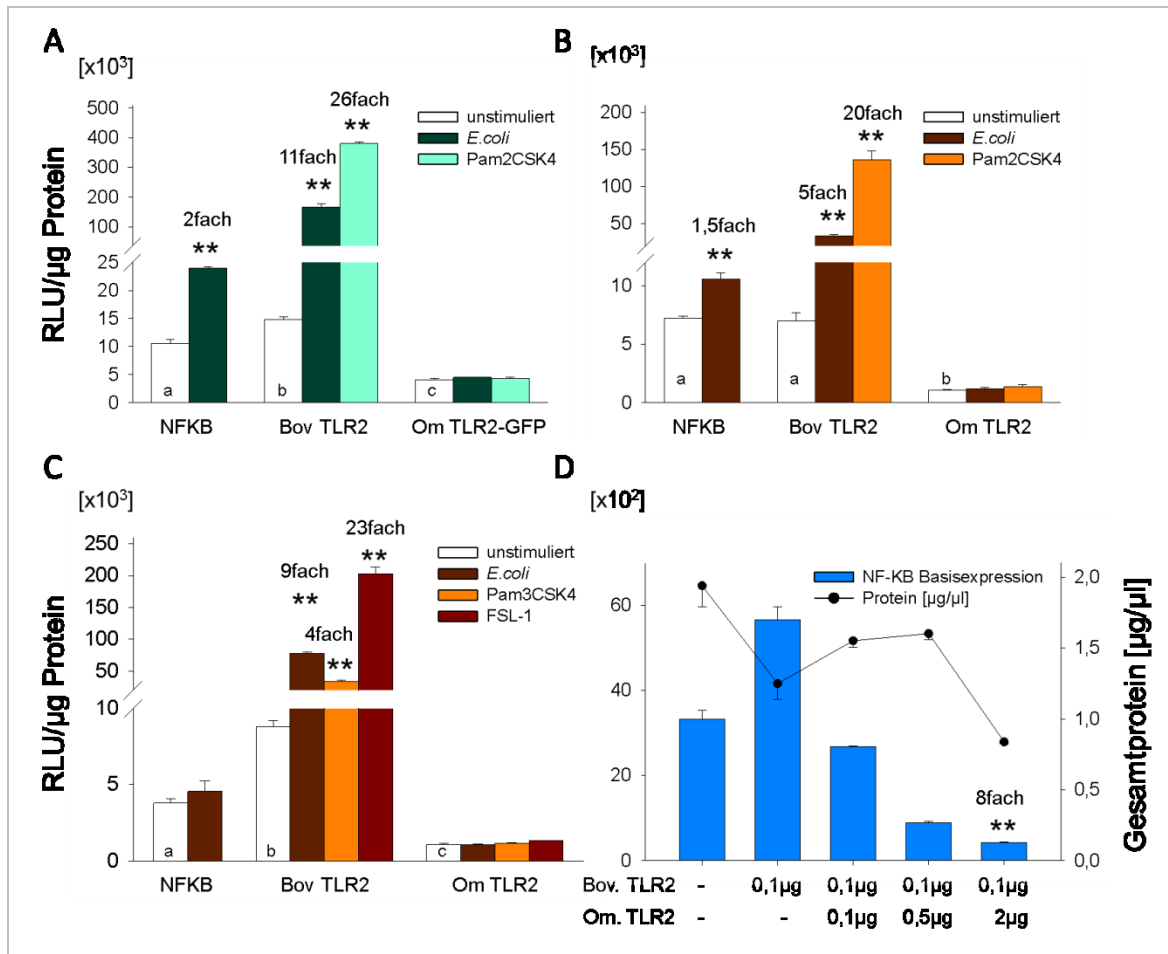


Abbildung 16: Ligandenspezifische Aktivierung des TLR2

Die HEK293-Zellen wurden in allen Ansätzen mit 50ng eines ELAM-getriebenen NF-κB-Reporterplasmids transfiziert. Darüber hinaus wurden die in der Abszisse angegebenen Expressionsplasmide (boviner oder Forellen-TLR2) eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge wurde jeweils mit leerem Expressionsvektor konstant gehalten (4,15 μg). Die Ordinate gibt die *relative light units* (RLU) der Luciferase im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration an. Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede der NF-κB-Basisexpression ($p < 0,001$). Die Ansätze wurden jeweils 24 h mit den TLR-Liganden inkubiert.

A) Parallele Ansätze von HEK293-Zellen, die ausschließlich mit dem NF-κB-Reporterplasmid transfiziert wurden, zusätzlich mit dem bovinen TLR2 (100 ng) oder zusätzlich mit dem Forellen-TLR2-GFP-Konstrukt (1 μg) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit *E. coli* 13030 (30 μg / μl) sowie Pam2CSK4 (100 ng / ml) stimuliert.

B) Ansatz wie in A, unter Verwendung eines Forellen-TLR2-Konstruktes ohne GFP.

C) Ansatz wie in B, mit Stimulation durch *E. coli* 13030, Pam3CSK4 und FSL1.

D) Die Zellen wurden mit einer konstanten Konzentration von bovinen TLR2 und steigenden Konzentrationen des Forellen-TLR2 (Mengenangaben in der Abszisse) transfiziert. Die rechte Ordinate gibt die Proteinkonzentration [μg / μl] an. Die Ansätze wurden für 24 h mit 30 μg / ml inaktivierten *E. coli* 13030 stimuliert.

In einem ersten Versuch transfizierten wir das Forellen-TLR2-GFP-Konstrukt und parallel dazu den bovinen TLR2. Während die Stimulation des bovinen Faktors mit Hitze-getöteten *E.coli* Bakterien (Stamm 13030) sowie mit dem synthetischen Lipoprotein Pam2CSK4 zur Induktion des NF- κ B führte, zeigte die gleiche Behandlung bei den HEK293-Zellen mit dem Forellenfaktor keine Wirkung (Abbildung 16A). Um auszuschließen, dass Strukturveränderungen des Forellen-TLR2, verursacht durch die Kopplung an das GFP, die Ursache für die nichterfolgte Aktivierung der Signalkaskade sind, wurde das Experiment mit einem TLR2-exprimierenden Vektor wiederholt, welcher den Forellen-TLR2 ohne angehängtes GFP exprimiert. Auch in diesem Versuch wurde die Signalkaskade in den Zellen mit dem Forellenfaktor nicht aktiviert (Abbildung 16B). Auch die Stimulation mit anderen Liganden des Säuger-TLR2, wie Pam3CSK4 und FSL-1, führte nicht zur Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors über das Forellen-TLR2 (Abbildung 16C). Die drei Infektionsversuche zeigten aber, dass der Forellenfaktor die NF- κ B-Basisexpression der unstimulierten Zellen herabsetzt.

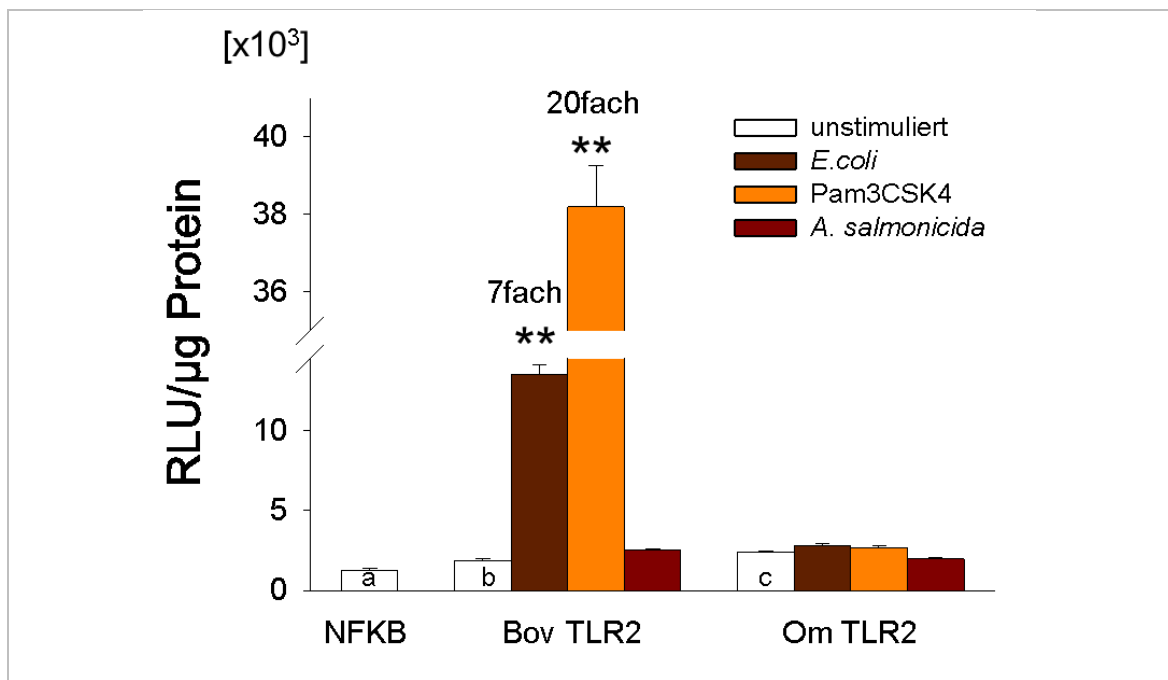


Abbildung 17: Keine Aktivierung des TLR2 durch *A. salmonicida*

Die HEK293-Zellen wurden in jedem Ansatz mit 50 ng eines ELAM-getriebenen NF- κ B-Reporterplasmids sowie mit den in der Abszisse benannten Expressionsplasmiden transfiziert. Die eingesetzte DNA-Menge wurde jeweils mit leerem Expressionsvektor konstant gehalten (4,15 μ g). Die Ansätze wurden jeweils 24 h mit *E.coli* 13030 (30 μ g / μ l), Pam3CSK4 (100 ng / ml) und hitzegetöteten *A. salmonicida subsp. salmonicida* (30 μ g / ml) stimuliert. Die Ordinate gibt die RLUs der Luciferase im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration an. Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede der NF κ B-Basisexpression ($p < 0,001$).

Diese Hemmung zeigte sich auch bei HEK293-Zellen, denen zum bovinen TLR2-Konstrukt zusätzlich das Forellen-TLR2-Konstrukt in steigender Konzentration transfiziert wurde (Abbildung 16D).

Bei der Transfektion von 2 µg des Forellen-TLR2-Konstruktes war die NFκB-Basisexpression 8-fach herabgesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Forellen-TLR2 einen Einfluss auf die NF-κB-Homöostase in der Säugerzelle hat.

Abschließend prüften wir die NF-κB-Induktion durch hitzegetötete *A. salmonicida* (Abbildung 17). Sowohl der bovine, als auch der Forellen-TLR2 konnten NF-κB durch Stimulation mit dem Forellenpathogen nicht aktivieren.

3.1.2 Der IRAK4-Faktor der Salmoniden

Aufbauend auf Ergebnisse meiner Diplomarbeit wurde der IRAK4-Faktor der drei Salmoniden Regenbogenforelle, Atlantischem Lachs und Ostseeschnäpel weiter untersucht. Neben einer erwartungsgemäß gespleißten IRAK4-cDNA transkribiert die Regenbogenforelle eine kurze Variante (IRAK4s), welche entweder von einem zweiten *IRAK4*-Gen stammte, oder eine partiell gespleißte Kopie des funktionalen *IRAK4*-Gens darstellt. Darüber hinaus war nur eine nicht vollständig gespleißte IRAK4-cDNA-Variante des Atlantischen Lachs in der NCBI-Datenbank abgelegt.

Tabelle 30: Übersicht über die ermittelten IRAK4-Sequenzen

	O.myk	O.myk (<i>IRAK4s</i>)	C.mar	S.sal
Gen	FN598578	HG530316	FN598581	FN598579 (Exon 1-8) * ¹
	(Exon 1-9) * ¹	(Exon 1-3)	(Exon 1-9) * ³	FN598580 (Exon 9-11) * ¹
cDNA	FN598575 * ¹	FN598577 * ²	FN598576* ⁴	HG422172
Protein	CBI63173		CBI63174	CDG49297

*¹ Die Sequenzen wurden bereits in der Diplomarbeit beschrieben.

*² Die Sequenz wurde für die Doktorarbeit durch einen 5'-RACE vervollständigt.

*³ Die unvollständige Intronstruktur wurde für die Doktorarbeit vervollständigt.

*⁴ Das 3'-Ende wurde kontrolliert und das korrekte Stopcodon ermittelt.

Deshalb sollte ein funktionaler und konventioneller Lachs-IRAK4-Faktor isoliert werden. Um die Struktur und Sequenz des IRAK4 der Salmoniden vollständig aufzuklären, isolierten oder vervollständigten wir die in Tabelle 30 aufgeführten Sequenzen.

Darüber hinaus wurde die Gewebe-spezifische und infektionsabhängige Expression sowie die Beteiligung des IRAK4-Faktors an der TLR-Signaltransduktion in der Regenbogenforelle untersucht.

3.1.2.1 IRAK4-cDNA der Salmoniden

Für die Ermittlung der IRAK4-cDNA der Regenbogenforelle wurden drei homologe Forellen-ESTs ([BX884975](#), [BX884289](#) und [BX885837](#)) gefunden und für die Ableitung von *Primern* verwendet [IRAK4_f1: 5' TTGGATGGTAGCCCTCCTCTTT 3' (Pos. 890 bp bis 911 bp) und IRAK4_r1: 5' CTTTCATCTCCATCAGGAAGTTG 3' (Pos. 1243 bp bis 1265 bp); beide [FN598575](#)]. Das so erhaltene erste Forellen-*IRAK4*-Fragment wurde sequenziert und zur Ableitung von *Primern* für eine 3'RACE [IRAK4_f2: 5' CAACCACCATGTCCACAGAG 3' (Pos. 973 bp bis 992 bp) und IRAK4_f3: 5' ATGAAAACCGTGATCCCAAG 3' (Pos. 1227 bp bis 1246 bp); beide [FN598575](#)] genutzt. Darauf wurde ein f-*Primer* [IRAK4_f4: 5' AGGGATGGTAG GCAACAGTG (Pos. 737 bp bis 756 bp; [NM_001141766](#))] im 5'-Bereich der bereits veröffentlichten Lachs-IRAK4-cDNA abgeleitet. Kombiniert mit dem r-*Primer* [IRAK4_r2: 5' CTCTGTGGACATGGTGGTTG 3' (Pos. 973 bp bis 992 bp; [FN598575](#))] konnte die IRAK4-cDNA in Richtung 5'-Ende verlängert werden. Abschließend konnte durch eine 5'RACE mit den *Primern* [IRAK4_r3: 5' TTGCCTACCATCCCTTTGTC 3' (Pos. 419 bp bis 438 bp) und IRAK4_r4: AGTACCTCGGCTCCCCTGT (Pos. 185 bp bis 203 bp); beide [FN598575](#)] das 5'-Ende aufgeklärt werden. Die gesamte IRAK4-cDNA-Sequenz der Forelle umfasst 1631 bp, bestehend aus einem 5'-UTR mit 58 bp, einem offenem Leserahmen mit 1425 bp und einem 3'-UTR mit 127 bp. Als Stoppsignal dient ein [TAG]-Codon, an das sich nach 105 bp ein nicht-kanonisches Polyadenylierungssignal [AATATA] anschließt. Der Poly(A)-Schwanz war 16 bp stromabwärts angehängt.

Neben dieser cDNA entdeckten wir auch eine andere cDNA-Kopie eines Forellen IRAK4-Gens (IRAK4s; [FN598577](#)). Die isolierte Sequenz umfasst 1357 bp und ist polyadenyliert. Im Vergleich mit der volle-Länge-IRAK4-cDNA zeigte sich eine

100 %ige Identität zwischen Pos. 778 bp und 1192 bp. Die konzeptionelle Translation ergab unter der Verwendung des ersten [ATG]-Startcodons der Translation (Pos. 129 bp bis 131 bp) keinen durchgehenden offenen Leserahmen. Unter der Verwendung des Startcodons von Pos. 734 bp bis 736 bp ergibt sich jedoch ein 459 bp langer offener Leserahmen (OLR), der einen verstümmelten C-terminalen Teil des IRAK4 kodieren könnte. An das potentielle Stoppsignal [TGA] schließt sich nach 135 bp ein nicht-kanonisches Polyadenylierungssignal [AAAATA] an. Der Poly (A)-Schwanz liegt sechs bp hinter dem Poly (A)-Signal.

Die IRAK4-cDNA des Ostseeschnäpels konnte parallel, zum größten Teil unter der Verwendung der gleichen *Primer* ermittelt werden. Für das 5'-RACE-Experiment wurden Art-spezifische *Primer* abgeleitet [IRAK4_r5: 5' TGGCTCATCAAAATGTC CAC 3' (Pos. 400 bp bis 419 bp) und IRAK4_r6: 5' CCCCTGTAAACTACTGCT TCAA 3' (Pos. 314 bp bis 336 bp); beide [FN598576](#)]. Die ermittelte Sequenz verfügt über ein 5'-UTR von 147 bp, einen offenen Leserahmen von 1425 bp und einen 3'-UTR von 250 bp. Als Stoppsignal dient [TGA]. Nach 75 bp schließt sich ein kanonisches Polyadenylierungssignal [AATAAA] an. Der Poly (A)-Schwanz folgt 14 bp stromabwärts.

In der veröffentlichten IRAK4-cDNA-Sequenz [NM_001141766](#) (LEONG *et al.*, 2010) des Atlantischen Lachs fanden wir ein Stopcodon (Pos. 519 bp bis 521 bp; [NM_001141766](#)), das einen 665 bp langen 5'-UTR verursachen würde. Diese cDNA würde nur zur Expression eines verstümmelten IRAK4-Proteins führen. Mit den *Primern* [IRAK4_f5: 5' CCGAGGATGAGCAACACAATAACA 3' (Pos. 1 bp bis 24 bp) und IRAK4_r7: 5' TGAGGGAAAGTCGTTCTTCCTGTT 3' (Pos. 1422 bp bis 1445 bp); beide [HG422172](#)] amplifizierten wir ein 1445 bp langes Fragment. Seine cDNA-Sequenz wies höchste Ähnlichkeit zur Forellen-IRAK4-cDNA auf. Die konzeptionelle Translation der vollständig gespleißten Lachs-IRAK4-mRNA ergibt eine Proteinsequenz mit einer Länge von 470 Aminosäuren. Es zeigte sich, dass die vorher bekannte Sequenz nur von einer unvollständig gespleißten mRNA des korrekten *IRAK4*-Gens des Lachses stammen konnte.

3.1.2.2 *IRAK4*-Gen der Salmoniden

Für die Ermittlung der Genstrukturen leiteten wir *Primer* in bestimmten Abständen auf den Konsenssequenzen der cDNAs ab. Mit dieser *Primer walking*-Strategie isolierten wir die *IRAK4*-Gene von Lachs, Schnäpel und Forelle sowie das *IRAK4s* der Forelle. Der Vergleich der *IRAK4*-Genstruktur dieser drei Salmoniden mit der Struktur des orthologen humanen *IRAK4* zeigte, dass die Exon-/Intron-Struktur von Lachs- und humanen *IRAK4* die höchste Ähnlichkeit aufweisen. Beide Gene bestehen aus elf Exons, von denen sieben die gleiche Länge aufweisen. Der transkribierte Teil von Exon eins war sogar in allen untersuchten Vertebraten 161 bp lang. Im Schnäpel-*IRAK4*-Gen sind die Exons acht bis zehn fusioniert, während die anderen Exons, mit Ausnahme von Exon drei, genauso lang wie im Lachs-*IRAK4* sind. Im Forellen-*IRAK4* sind die Exons drei und vier, sowie die Exons acht und neun nicht von einem Intron getrennt. Darüber hinaus verfügt dieses Gen im Intron sieben über einen Minisatelliten [5' ACGACTGTT ATGATTTGTT 3']₄₆, der von einer *direct repeat* Sequenz [5' ATGGCTGT 3'] flankiert wird (Pos. 2524 bp bis 3464 bp; [FN598578](#)).

Das *de novo* sequenzierte *IRAK4s*-kodierende Gen ([HG530316](#)) besteht nur aus drei Exons. Mit Hilfe einer *Genome Walker library* wurde zusätzlich eine 690 bp lange Sequenz, die sich 5' an den Transkriptionsstartpunkt anschließt, isoliert. Das *IRAK4s*-Gen und das *IRAK4*-Gen der Forelle sind über 2090 bp zu 89,6 % identisch (Abbildung 18; Bereich zwischen der gestrichelten Linien). Darüber hinaus verfügt das *IRAK4s* über eine 333 bp lange Sequenz, die im Forellen-*IRAK4* deletiert ist. Diese Sequenz findet allerdings im Intron 3 des Lachses (60,8 % Identität; Tabelle 31) und des Schnäpels (89,6 % Identität) eine Entsprechung. In 3'-Richtung, anschließend an diesen Bereich fanden wir einen 295 bp langen Abschnitt, der sich vollständig vom Forellen-*IRAK4* unterscheidet, aber zu 94,5 % dem entsprechendem Bereich im Intron 8 des Lachs-*IRAK4* gleicht. Dieses Intron ist im Forellen- und im Schnäpel-*IRAK4* deletiert. In der *IRAK4s*-cDNA werden die Introns 3 bis 5 durchgehend transkribiert, während die Introns 6 und 7 dem funktionalen *IRAK4* entsprechend herausgespleißt werden.

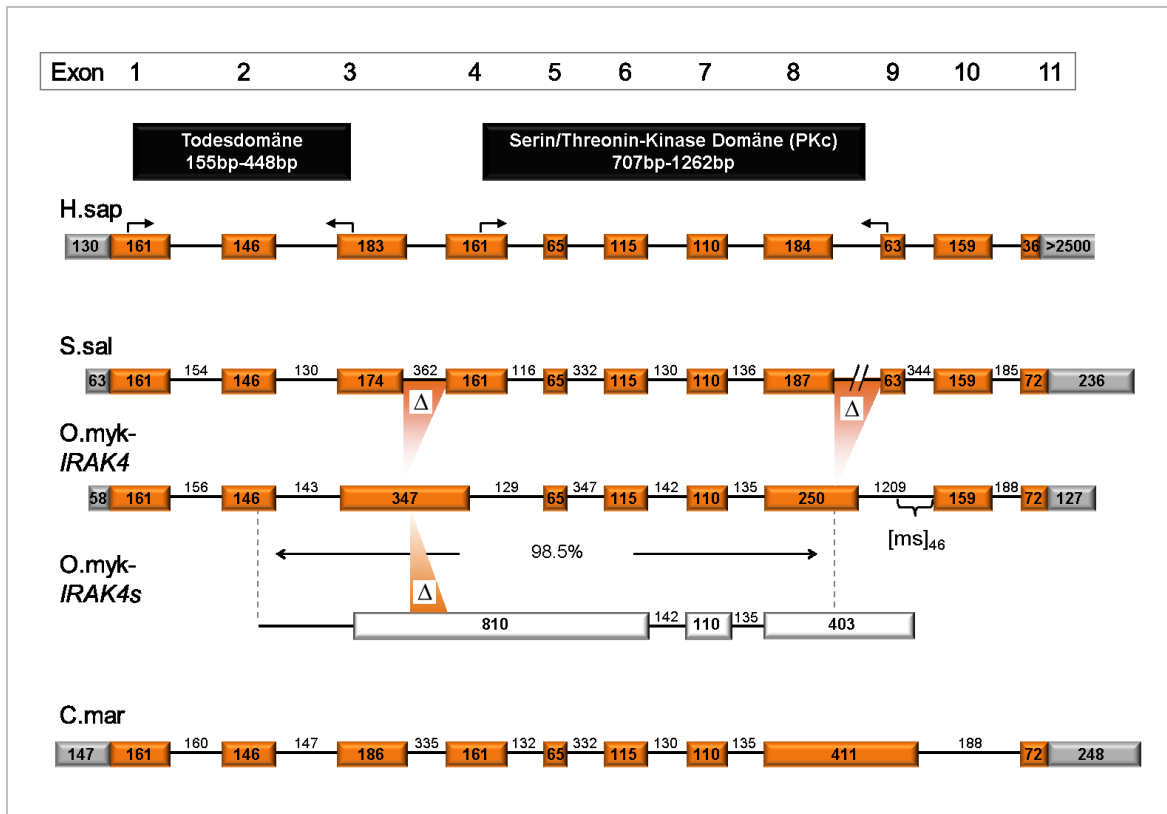


Abbildung 18: IRAK4-Gene der Salmoniden im Vergleich

Schwarz unterlegt sind die Proteindomänen, die von den entsprechenden Bereichen des Gens codiert werden. Die dazugehörigen Positionsnummern beziehen sich auf die humane IRAK4-cDNA-Sequenz (NM_001114182). Die Exons (Balken) sind skaliert, die Introns (Linien) nicht. Der proteinkodierenden Bereich des Gens (OLR) ist orange, die nicht proteinkodierenden Bereiche der mRNA im 5'- und 3'-Bereich (UTRs) sind grau gestaltet. Das transkribierte Pseudogen ist in Weiß gehalten. Die Zahlen in den Balken sowie auf den schwarzen Linien stehen für die Länge des Abschnitts [bp]. Δ gekennzeichnete Keile zeigen Deletionen auf. Die Position eines Minisatelliten in Intron 7 der Regenbogenforelle ist mit einer Schweifklammer markiert. Die zum Vergleich verwendeten DNA-Sequenzen von *H. sapiens*; *Salmo salar*; *O. mykiss* und *Coregonus maraena* sind mit den Referenznummern im Anhang gelistet.

Die größeren Übereinstimmungen des *IRAK4s* mit dem Lachs-*IRAK4* ließen sich auch mit einem DNA-basierendem Stammbaum (Abbildung 19) validieren.

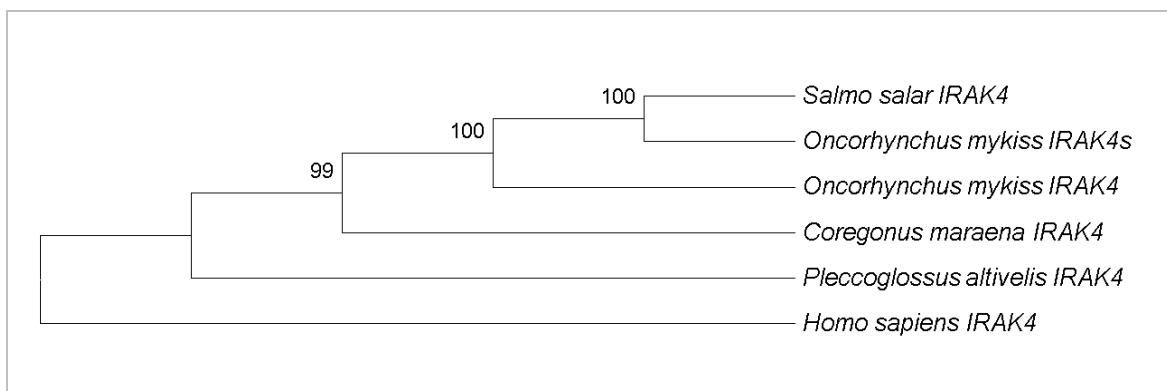


Abbildung 19: Phylogenetischer Vergleich der IRAK4-Gene der Salmoniden

Die Bootstrap-Werte an den Abzweigungen basieren auf 10000 Replikate und sind ein Maß für die Trennschärfe der verschiedenen IRAK4 Gene. Als Außengruppe dient das humane IRAK4. Die im Alignment verwendeten DNA-Sequenzen sind mit den Referenznummern im Anhang gelistet.

Zusätzlich zeigte sich im Sequenzvergleich, dass die Introns innerhalb der Salmoniden einen hohen Grad an Identitäten aufwiesen. Die DNA-Sequenzen von Introns 5 und 6 des Lachs- und des Schnäpel-IRAK4 waren sogar zu 100 % identisch.

Tabelle 31: Sequenzidentitäten des *IRAK4*-Gens der Salmoniden

Intron	Position	O.myk_IRAK4	O.myk_IRAK4s	C.mar_IRAK4
1	176 – 299	96,0	-	88,5
2	476 – 605	82,5	84,0	66,2
3	780 - 1141	deletiert	60,8	63,0
4 ^a	1303 - 1418	80,8	81,4	75,2
5 ^a	1484 – 1815	89,2	89,2	100
6 ^a	1931 – 2040	78,2	84,4	100
7 ^a	2171 – 2306	97,1	97,1	91,9
8 ^a	2494 ->4741	deletiert	94,5 ^d	deletiert
9 ^b	64 – 407	80,9 ^c	deletiert	deletiert
10 ^b	569 - 751	69,5	-	70,1

Die IRAK4-Sequenzen von Regenbogenforelle und Ostseeschnäpel wurden mit dem des Atlantischen Lachs verglichen.

^a Introns die mit dem Kinasedomäne-kodierenden Bereich assoziiert sind;

^b Intron 9 und 10 auf Sequenz FN_598580;

^c Der Minisatellit von Position 2564 bis 3467 wurde aus dem *Alignment* ausgeschlossen;

^d Das Intron 8 des Lachs-IRAK4 wird im IRAK4s transkribiert

Alle transkribierten Introns wurden in fettgedruckten Zahlen dargestellt. Verglichen wurde eine konservierte Sequenzüberlappung von 221bp.

3.1.2.3 Funktionale Gliederung des IRAK4-Faktors der Salmoniden

Auf der Aminosäure-Ebene zeigte sich, dass das IRAK4-Protein in der Evolution stark konserviert wurde. Die Gesamt-Aminosäuresequenz der Regenbogenforelle hat etwa 60 % der Aminosäuren gemeinsam mit den Säugern (*Homo sapiens*), Vögeln (*Taeniopygia guttata*) und Amphibien (*Xenopus tropicalis*). Die IRAK4-Faktoren der Salmoniden gleichen sich zu über 90%. Im Vergleich mit den IRAK4-Proteinen anderer Fischarten, zeigten sich Sequenzidentitäten von etwa 60 % bei *Takifugu rubripes* bis 70 % beim Salmoniformes *Plecoglossus altivelis*. Im Vergleich mit dem frühesten Vertebraten *Branchiostoma floridae* (Lanzettfischen) waren die Aminosäuresequenzen zu etwa 38 %, mit den Invertebraten *Euprymna scolopes* und *Haliotis diversicolor* zu etwa 35 % identisch.

Im Aminosäure-*Alignment* zeigten sich stärker und schwächer konservierte Bereiche (Anhang 3.4). Mit dem *Onlinetool* BLAST wurden die stärker konservierten Bereiche als Funktionsdomänen identifiziert.

Tabelle 32: Sequenzidentitäten gegenüber dem Forellen-IRAK4

	Länge	Anteil der Übereinstimmungen [%]			
		Gesamt	Todesdomäne	Verbindung	Kinase-domäne
A) cDNA [bp]			Pos. 83 - 373	377 - 634	638 - 1204
H.sap	1623	59,5	62,8	49,4	68,4
T.gut	1395*	62,2	58,4	53,3	67,0
X.tro	2127	63,4	58,1	51,9	65,4
C.mar	1619	92,5	94,9	95,4	96,5
S.sal	1601	94,8	97,6	92,3	98,2
P.alt	1425*	77,0	76,6	68,4	82,3
D.rer	1602	54,9	62,5	53,1	63,9
T.rub	1170*	63,8	69,8	53,8	72,0
B.flo	1344*	57,8	54,0	44,9	60,7
E.sco	1646	49,1	52,2	46,4	55,3
H.div	2062	59,8	54,3	62,8	59,3
B) As [aa]			Pos. 9-106	107 – 193	194 - 380
H.sap	460	54,1	56,2	32,8	69,3
T.gut	464	52,4	55,7	21,8	67,7
X.tro	457	53,6	55,7	29,1	66,7
C.mar	474	93,9	92,8	88,5	97,9
S.sal	470	97,5	95,9	92,0	100
P.alt	463	70,2	77,3	26,3	88,4
D.rer	483	57,0	62,0	50,0	60,8
T.rub	454	60,3	64,6	36,1	74,1
B.flo	447	38,3	37,1	12,5	55,3
E.sco	537	34,8	37,5	30,8	48,7
H.div	516	34,8	34,0	29,9	43,1

Für das cDNA-*Alignment* (A) sowie für das Aminosäure-*Alignment* wurden die Sequenzen (siehe Anhang) von *H. sapiens*; *T. guttata*; *X. tropicalis*; *O. mykiss*; *C. maraena*; *S. salar*; *P. altivelis*; *D. rerio*; *T. rubripes*; *Branchiostoma floridae*; *Euprymna scolopes*; *Haliotis diversicolor* verwendet. Die Positionen der cDNA-Sequenzen wurden von der IRAK4-cDNA-Sequenz abgeleitet: Todesdomäne Pos. 83 bp bis 373 bp; Verbindung Pos. 374 bp bis 634 bp; Kinasedomäne Pos. 635 bp bis 1204 bp. Die Positionen der Proteindomänen-kodierenden Bereich wurden von der IRAK4-Aminosäuresequenz der Regenbogenforelle abgeleitet: Todesdomäne Pos. T9 bis I105; Verbindung Pos. N106 bis R192; Kinasedomäne Pos. L193 bis I382. * In den Datenbanken fanden sich nur die offenen Leserahmen der IRAK4-cDNA.

Das IRAK4-Protein der Salmoniden besteht, wie auch bei anderen Vertebraten sowie bei Invertebraten, aus einer N-terminalen Todesdomäne (Pos. T9 bis I105; [CBI63173](#)) und einer C-terminale Serin-Threonin-Protein-Kinase-Domäne (Pos. E195 bis I382; [CBI63173](#)). Der zwischen den funktionalen Domänen liegende Verbindungsbereich war zwischen den Spezies, mit Ausnahme der Salmoniden, kaum konserviert (Tabelle 32). Die Betrachtung der Konservierung der einzelnen Funktionsbereiche zeigte, dass die Aminosäure-Sequenz der Todesdomäne einen ähnlichen Konservierungsgrad zeigte wie die gesamte IRAK4-Aminosäure-Sequenz. Die Kinasedomäne war in diesem Zusammenhang wesentlich stärker konserviert.

Der Vergleich der Konservierung der IRAK4-Aminosäuresequenzen mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen zeigte einen niedrigeren Konservierungsgrad der Aminosäuresequenzen. Bei der Todesdomäne war dieses Verhältnis etwa gleich, bei der Kinasedomäne war die Aminosäuresequenz stärker konserviert als die cDNA-Sequenz. Dieser Hinweis auf negative Selektion der Funktionsdomänen wurde mit dem *Onlinetool* SNAP v1.1.1 (*Synonymous Non-synonymous Analysis Program*) bestätigt. Das Verhältnis der synonymen und nichtsynonymen Nukleotidaustauschen auf der cDNA wurde auf der Grundlage von 21 Sequenzvergleichen berechnet und betrug $0,499 \pm 0,056$ für die Todesdomäne sowie $0,728 \pm 0,043$ für die Kinasedomäne. Beim Verbindungsbereich war das Verhältnis $0,995 \pm 0,035$. Ein Wert von 1 bedeutet eine gleiche Wahrscheinlichkeit für den Austausch von synonymen und nichtsynonymen Nukleotiden.

Interessanterweise verkürzte sich der IRAK4-Faktor im Laufe der Evolution. Während das IRAK4-Protein bei den Invertebraten aus mehr als 500 Aminosäureresten besteht, sind es bei den Teleostei zwischen 483 und 470 Aminosäurereste. Bei den Tetrapoden ist die IRAK4-Protein-Sequenz nur noch 457 bis 461 Aminosäuren lang.

3.1.2.4 Phylogenetischer Vergleich der IRAK-Aminosäuresequenzen

Der Stammbaum in Abbildung 20 zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der IRAK-Faktoren. Die Gruppen der Faktoren IRAK1 bis IRAK4 grenzen sich klar voneinander ab und die von uns isolierten Faktoren von Forelle, Lachs und Schnäpel ordnen sich eindeutig in die IRAK4-Gruppe ein. Innerhalb der IRAK-Gruppen haben sich die Faktoren dem evolutionären Stammbaum entsprechend entwickelt. Darüber hinaus zeigte sich eine nahe Verwandtschaft des IRAK4-Faktors von Invertebraten und dem

des Lanzettfischchen, einem basalen Chordaten. Der Stammbaum der IRAK4-Faktoren bestätigt weiterhin die Trennung von Agnathen (Kieferlose) und Gnathostomata sowie die Trennung von Actinopterygii (Strahlenflosser) und Sarcopterygii (Fleischflosser).

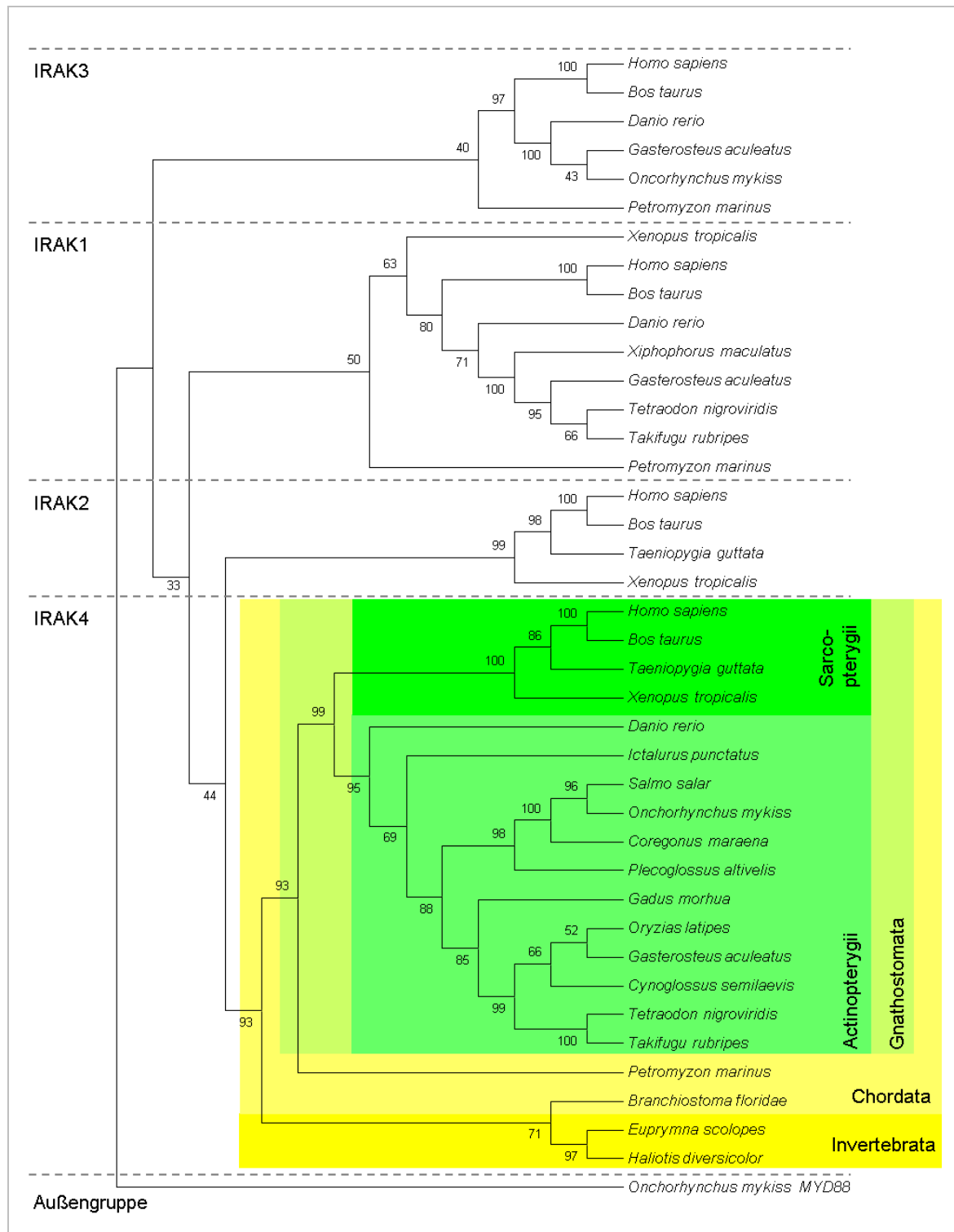


Abbildung 20: Phylogenetischer Vergleich der IRAK-Aminosäuresequenzen

Die Bootstrap-Werte an den Abzweigungen basieren auf 10000 Replikate und sind ein Maß für die Trennschärfe der verschiedenen TLR2 Faktoren. Als Außengruppe dient der humane TIR-Domänen-Adapter MYD88. Die im *Alignment* verwendeten Aminosäuresequenzen sind mit den Referenznummern im Anhang gelistet.

3.1.2.5 Gewebe-spezifische Expression des *IRAK4* und *IRAK4s* der Regenbogenforelle

Die Gewebe-spezifische Expression beider Faktoren wurde in zehn verschiedenen Geweben von jeweils vier gesunden Fischen mit Hilfe der *Real-Time*-quantitativen-PCR analysiert. Die *IRAK4*-mRNA-Konzentration zeigte sich in Kopfniere, Milz und Körpnere am höchsten und war etwa zehnmal höher als im Muskelgewebe. In Flosse, Kieme, Darm und Fett lagen moderate, in Herz und Leber niedrige *IRAK4*-Level vor. Die Konzentration der *IRAK4s*-mRNA-Konzentration betrug im Vergleich zur *IRAK4* mRNA in allen Geweben etwa 8 % (Abbildung 21).

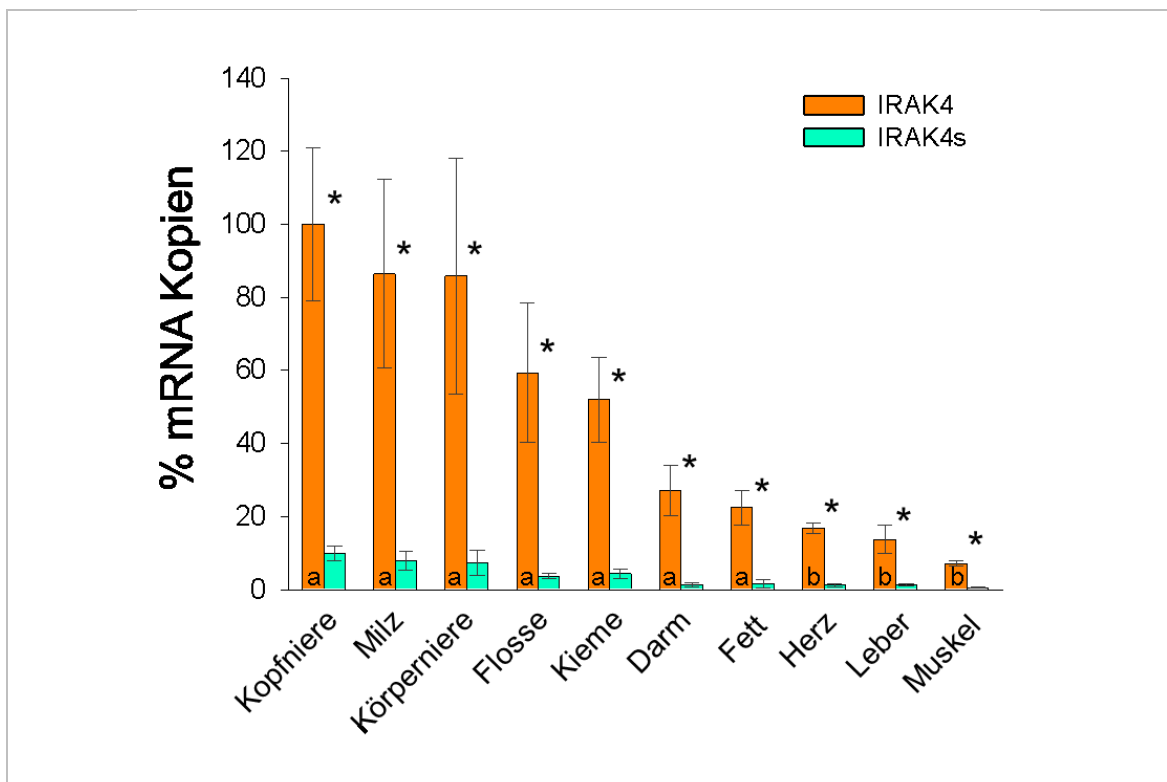


Abbildung 21: Gewebe-spezifische Expression von *IRAK4* und *IRAK4s* der Regenbogenforelle
Gewebe-spezifische mRNA-Konzentrationen von *IRAK4* und dem vermeintlichen Pseudogen *IRAK4s* (n = 4). Die mRNA-Kopienzahl in der Kopfniere wurden 100 % gesetzt und zur Normalisierung in den anderen Geweben genutzt. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den.

3.1.2.6 Funktionale Analysen zum Forellen-*IRAK4* im HEK293 Zellmodell

Anschließend an die strukturellen und evolutiven Analysen untersuchten wir die Beteiligung des *IRAK4*-Faktors der Regenbogenforellen an der TLR-assoziierten Signalkaskade. Zunächst klonierten wir den volle-Länge-*IRAK4*-Faktor in einen CMV-

getriebenen Expressionsvektor (YANG *et al.*, 2008) hinter den CMV Promotor und vor eine StrepTactin-Bindungsdomäne. Letztere wurde dann gegen eine GFP-Domäne ausgetauscht. Der so modifizierte Expressionsvektor wurde in HEK293-Zellen exprimiert. Den Nachweis für die Expression des IRAK4-GFP zeigen wir im Western Blot sowie mit Fluoreszenzmikroskopie. Das Konstrukt aus IRAK4 und GFP kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 80 kDa (Abbildung 22A). In den HEK293-Zellen lag das Protein cytosolisch in der gesamten Zelle verteilt vor (Abbildung 22B).

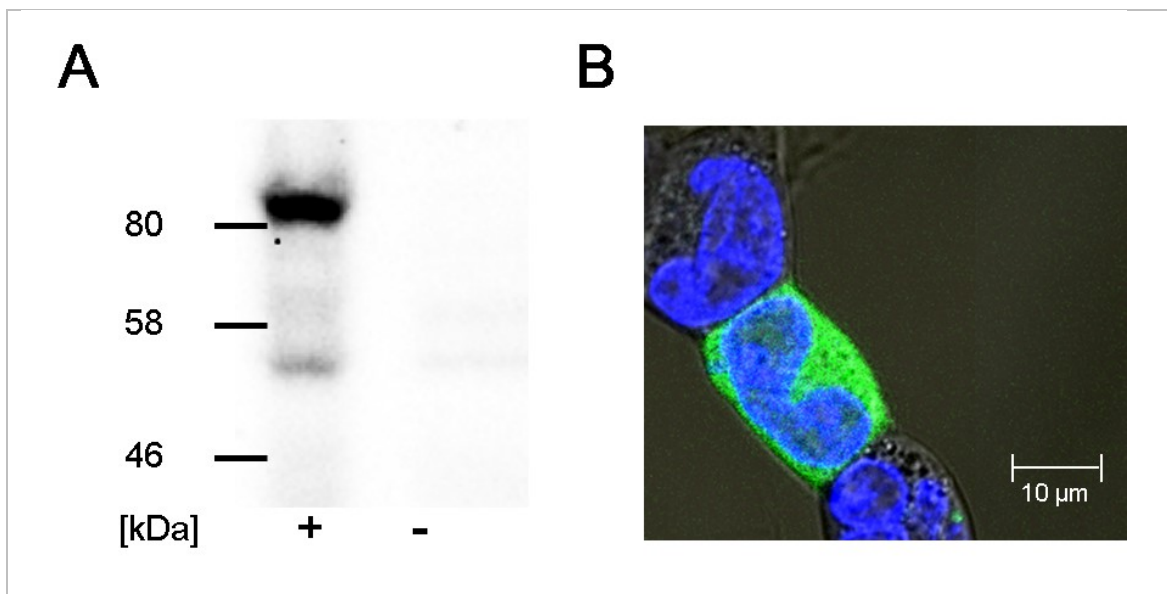


Abbildung 22: Nachweis der Expression des IRAK4-GFP-Konstruktes

A) Westernblot mit einem GFP-Antikörper von einem Zellextrakt aus HEK293-Zellen 24 h nach Transfektion mit dem IRAK4-GFP-Expressionsplasmid.

B) Das Forellen-IRAK4-GFP wurde analog zu A) in der HEK293 exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (1 µg/ml) markiert.

Um die Auswirkung von überexprimierten Forellen-IRAK4 auf die TLR-Signalkaskade aufzuklären, nutzten wir die Reporteranalyse, analog zu den TLR2 Expressionsversuchen (Punkt 3.1.1.6)

In parallelen Ansätzen wurden steigende Mengen der Forellen-IRAK4-Konstrukte (mit und ohne GFP) zu einer konstanten Menge des etablierten bovinen TLR2-Konstruktes transfiziert. Die Überexpression des IRAK4-GFP-Konstruktes führte bei einer Zugabe von 1 µg des Plasmids zur signifikanten Absenkung der NF-κB-Basisexpression. Bei dieser Plasmid-Konzentration sank auch die NF-κB-Induktion in den infizierten Zellen. Beim Einsatz von 4 µg des IRAK4-GFP-Konstruktes verstärkte sich der Effekt noch (Abbildung 23A). Um auszuschließen, dass die Kopplung an den GFP-Faktor eine störende Wirkung auf die NF-κB-Expression hatte, wurde in das IRAK4-

Expressionsplasmid mit *Site-directed mutagenesis* ein Stopcodon stromaufwärts vom GFP-kodierenden Bereich eingefügt. Die Wiederholung des Expressionsversuches mit diesem Konstrukt führte zu ähnlichen Resultaten (Abbildung 23B).

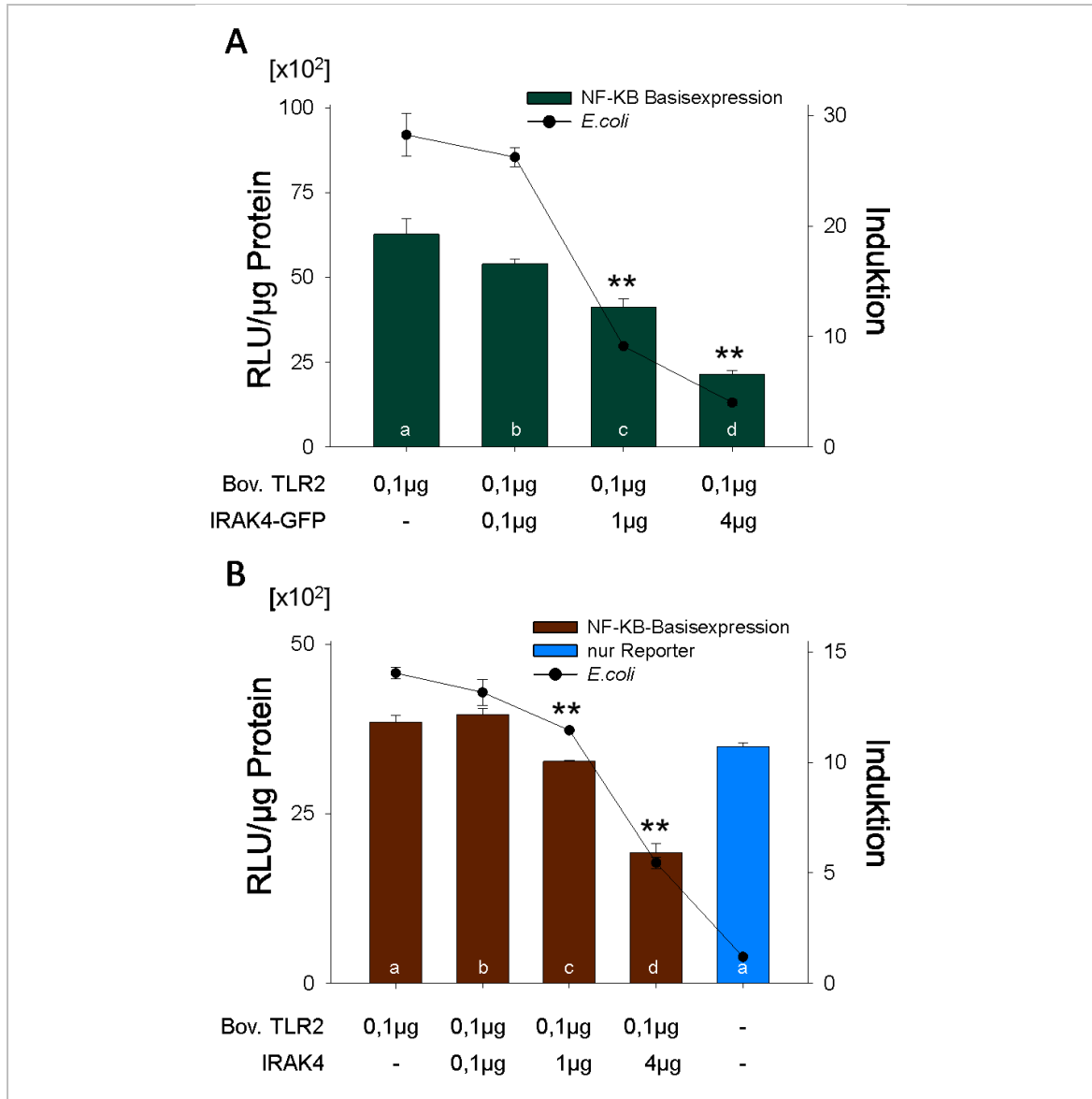


Abbildung 23: Expression der IRAK4-Expressionsplasmide

Die HEK293-Zellen wurden in allen Ansätzen mit 50ng eines ELAM-getriebenen NF-κB-Reporterplasmids transfiziert. Darüber hinaus wurden die in der Abszisse angegebenen DNA-Mengen der beiden Expressionsplasmide (boviner oder Forellen-IRAK4) eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge wurde jeweils mit leerem Expressionsvektor konstant gehalten (4,15 µg). Die linke Ordinate gibt die RLU der Luciferase im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration an. Die rechte Ordinate dient der Darstellung der Induktion (RLUs der Ansätze im Verhältnis zur Kontrollgruppe ohne IRAK4-GFP-beziehungsweise IRAK4- Expressionsplasmid). Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede der NF-κB-Basisexpression ($p < 0,001$). Die kotransfizierten Zellen wurden für 24 h mit 30 µg / ml inaktivierten *E.coli* 13030 stimuliert.

A) Die Zellen wurden mit einer Konstanten Konzentration von bovinen TLR2 und steigenden Konzentrationen des Forellen-IRAK4-GFP-Konstruktes transfiziert.

B) Die Zellen wurden analog zu A) nur mit dem Forellen-IRAK4-Konstrukt ohne GFP transfiziert. Zusätzlich wird ganz rechts (blau) die NF-κB-Basisexpression sowie die Induktion ohne TLR2- und ohne IRAK4-Transfektion gezeigt.

3.2 Expressionsmodulationen von Faktoren des angeborenen Immunsystems im Verlaufe einer Infektion mit *A. salmonicida*

3.2.1 Validierung der Infektion

Die Regenbogenforellen wurden mit einer hohen Dosis (1×10^7 KBE) *A. salmonicida* intraperitoneal infiziert. Diese Konzentration führt zu einer 100 %igen Mortalität nach drei bis vier Tagen und einer einheitlichen Symptomatik unter den Individuen. Zum letzten Probenzeitpunkt (72 h pI) zeigten die Versuchstiere typische Symptome einer akuten Infektion, wie apathisches Verhalten, Blutungen in der Leber und geschwollene Eingeweide.

3.2.1.1 Aktivierung von Zytokinen

Es ist vom Säuger bekannt, dass Zytokine eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen. Die Zytokine IL1B, TNF, IL8, IL10 und TGFB1 sind Indikatoren für Infektionen. Sie wurden bereits für verschiedene Fischarten beschrieben.

12 h pI waren in der Milz (Abbildung 24) IL1B, TNF, IL8 stark induziert. IL1B war ~ 50-fach, IL8 ~ 30-fach und TNF 8-fach hochreguliert. IL10 und TGFB1 waren in der Milz nicht reguliert.

Die infektionsabhängige Zytokinexpression von Milz, Kopfnieren, Leber und Thymus ist im Anhang 3.6 in einer Tabelle zusammengefasst. Sechs bis zwölf Stunden pI waren die in der Milz hochregulierten Gene (IL1B, TNF, IL8) auch in den Geweben Kopfnieren und Leber induziert. IL8 wurde nach einer Plateauphase auf niedrigem Level 72 h pI in Milz (~ 18-fach), Kopfnieren (~ 24-fach) und Leber (~ 39-fach) ein zweites Mal induziert. IL10 wurde nur in Kopfnieren und Leber infektionsabhängig induziert. In der Kopfnieren war IL10 12 h pI etwa 54-fach und in der Leber etwa 4-fach hochreguliert. TGFB war ausschließlich 24 h pI in der Leber 2-fach signifikant erhöht. Im Thymus fand sich unter den analysierten Zytokinen nur IL1B zum Zeitpunkt 12 h pI induziert.

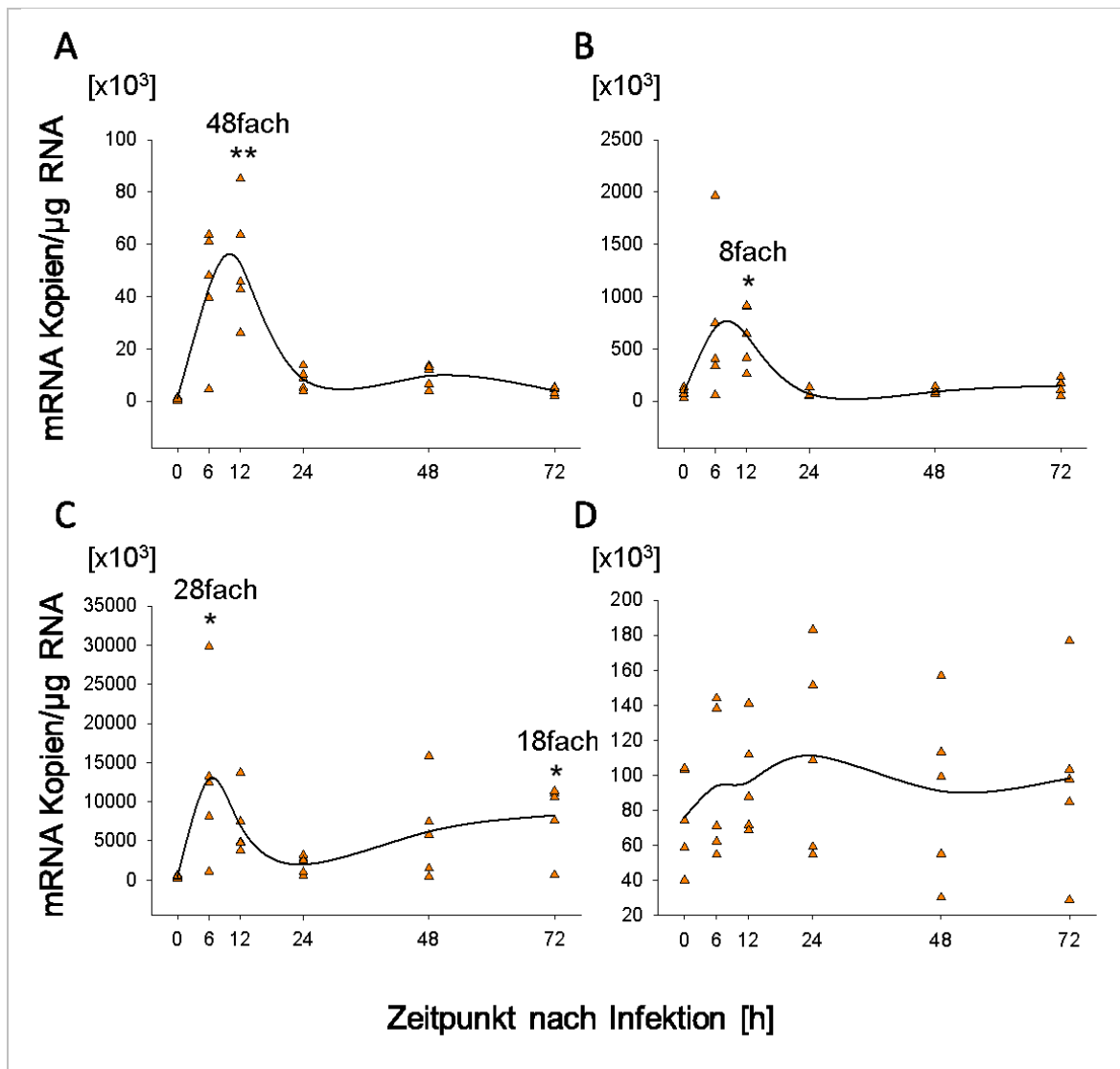


Abbildung 24: Infektionsabhängige Zytokinexpression in der Milz

In der Ordinate sind mRNA Kopien je µg RNA aufgetragen, in der Abszisse die Zeitpunkte nach der Infektion. Von allen Probenzeitpunkten wurden die Einzelwerte als Dreiecke aufgetragen und der Mittelwert mit einer Linie dargestellt. Die Signifikanzen wurden für den Vergleich mit der 0 h-Kontrollgruppe berechnet.

A) IL1B; B) TNF; C) IL8; D) IL10

3.2.1.2 Migration von Leukozyten im Intraperitoneum

Die Migration von Immunzellen ist ein weiterer Marker für Infektionen. Mit Hilfe der FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) - Methode konnte am Ort der Injektion, im Peritoneum, 12 h pI signifikant erhöhte Gesamtleukozytenzahlen festgestellt werden (Abbildung 25A). Das Zellsortieren mit der FACS-Methode ermöglichte außerdem die Diskriminierung von myeloiden (Granulozyten) und lymphoiden (T-/B-Lymphozyten) Immunzellen (Abbildung 25B und C). Die Zellzahl der myeloiden Zellen stieg bereits 6 h pI an und erreichte 12 h pI ein Plateau mit einer hochsignifikanten, 162-fach

höheren Zellzahl (Vergleich mit 0 h-Kontrollgruppe). Lymphoide Zellen wurden ebenfalls 12 h pI im Peritoneum rekrutiert, jedoch erfolgte dies im Vergleich mit den myeloiden Zellen auf niedrigerem Niveau. 72 h pI erreichten die myeloiden Zellen eine ebenfalls hoch signifikante 41-fache Zellzahl im Vergleich zur 0 h-Kontrollgruppe.

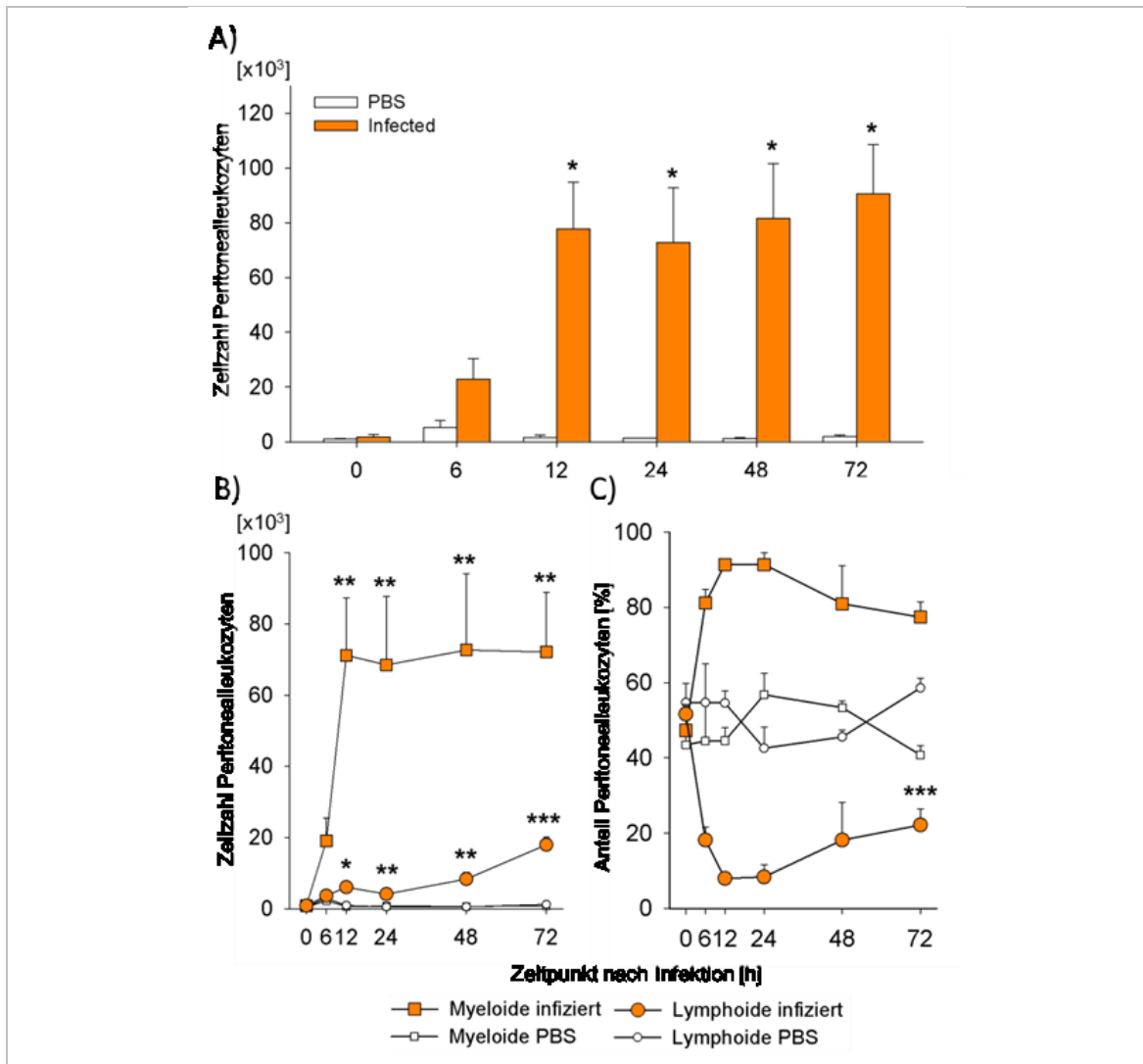


Abbildung 25: Infektionsabhängige Migration von Leukozyten

In allen Graphen zeigt die Abszisse die Zeitpunkte pI.

A) und B) In der Ordinate ist die absolute Zellzahl der aus dem Peritoneum isolierten Leukozyten aufgetragen. In den Signifikanztests wurden Messwerte der infizierten Tiere mit den jeweiligen Messwerten der PBS-Kontrollgruppe verglichen.

C) In der Ordinate sind die Anteile an Granulozyten und Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl aufgetragen. In den Signifikanztests wurden Messwerte der infizierten Tiere mit der 0 h-Kontrollgruppe verglichen.

Während die Immunzellen der Kontrollgruppen im gesamten Versuchszeitraum im Peritoneum in einem ausgewogenen Verhältnis vorlagen, stieg der Anteil an myeloiden Zellen 6 h pI in den infizierten Fischen an. Im gleichen Maße sank der Anteil an lymphoiden Zellen zu diesem Zeitpunkt ab. 12 h pI war das Verhältnis bei 90 %

myeloide Zellen zu 10 % lymphoide Zellen. 72 h pI war das Verhältnis noch etwa 80 % zu 20 %.

3.2.1.3 Expression des T-Zell-Rezeptors (TRB) und Immunglobulin M (IgM)

Der T-Zellrezeptor (TRB) wird ausschließlich auf den Membranen von T-Zellen exprimiert. Daher ist dieser Faktor ein guter Marker für die Anwesenheit von T-Lymphozyten. Das Immunglobulin M (IgM) wird ausschließlich von B-Lymphozyten exprimiert.

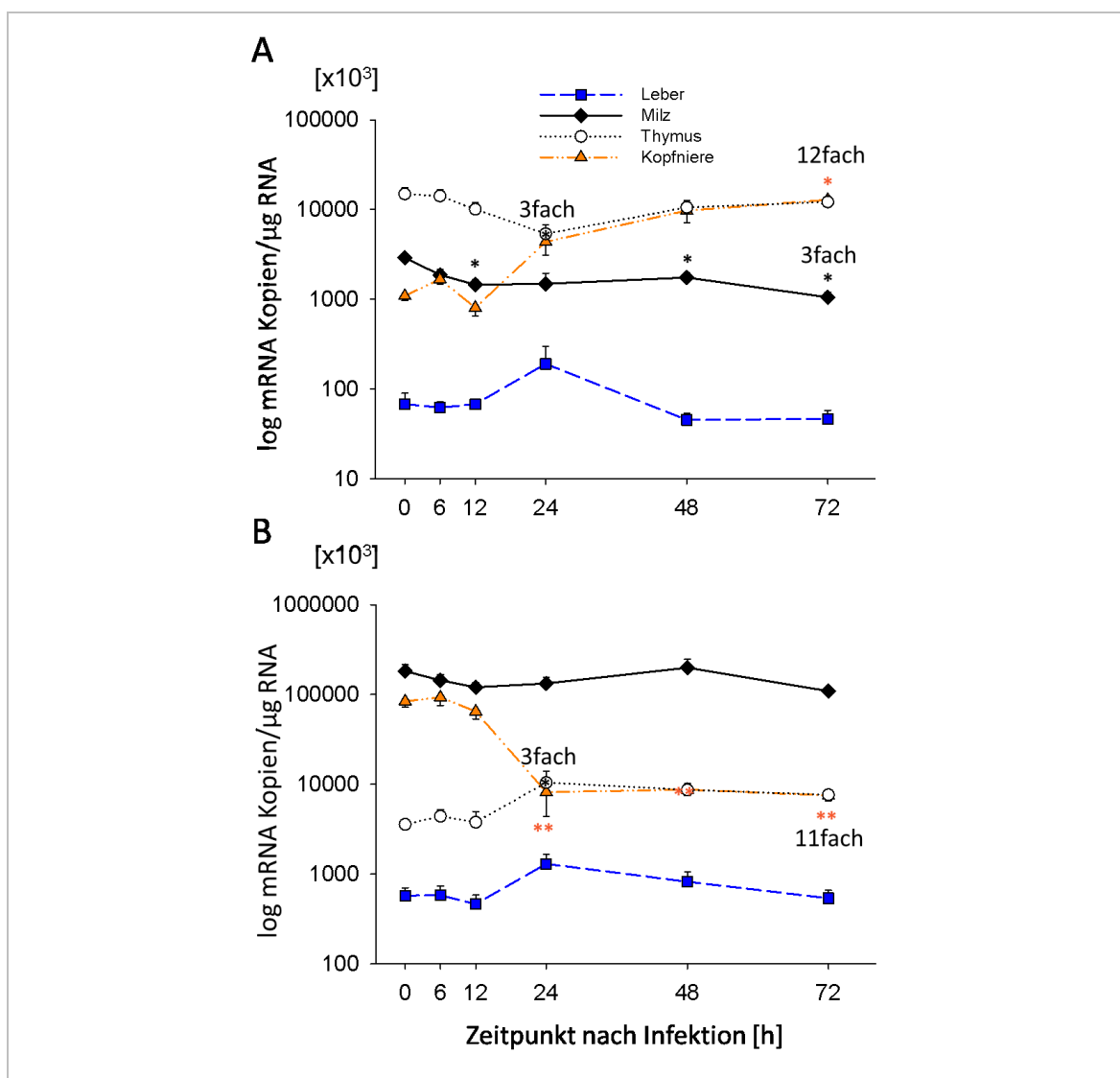


Abbildung 26: Infektionsabhängige Expression von TRB und IgM

In beiden Graphen zeigt die Abszisse die Zeitpunkte pI und die Ordinate den dekadischen Logarithmus der mRNA-Kopienzahl je µg RNA von A) TRB und B) IgM in den vier Geweben Milz, Kopfnieren, Leber und Thymus. Die Signifikanz wurde für den Vergleich mit der 0h Kontrollgruppe berechnet.

In der Kopfniere zeigte sich eine 12-fache Erhöhung der TRB-mRNA-Kopienzahl, während zum selben Zeitpunkt (72 h pI) die IgM-mRNA-Kopienzahl um den Faktor 11 sank (Abbildung 26). Im Thymus war es 24 h pI genau andersherum. Die TRB-mRNA-Konzentration war 3-fach niedriger und die IgM-mRNA 3-fach höher abundant. In der Milz sank die Kopienzahl von TRB 72 h pI um den Faktor drei. Die IgM-Kopienzahl war auf hohem Niveau konstant. In der Leber zeigte sich lediglich eine tendenzielle Erhöhung beider Faktoren 24 h pI.

Insgesamt belegt die Analyse der m-RNA-Konzentrationen der T- und B-Zell-Marker die starke Migrationen von Immunzellen, insbesondere in der Kopfniere, und damit die Aktivierung des Immunsystems.

3.2.2 Expression der TLRs

3.2.2.1 Vergleich der Infektionsabhängigen Expression der TLR2-Varianten

Die in Punkt 3.1.1.5 beschriebenen *Primerpaare* zur Diskriminierung der verschiedenen TLR2-Varianten wurden neben der Gewebe-spezifischen Expression auch eingesetzt, um ihre Regulation im Verlaufe einer Infektion zu ermitteln und sie zu vergleichen. Eine unterschiedliche Regulation der *TLR2*-Gene könnte einen Hinweis darauf geben, ob sie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.

Statistisch signifikante Unterschiede der mRNA-Kopienzahl zeigten sich im Verlauf der Infektion nur in der Milz (Tabelle 33). Das am höchsten abundante TLR2 (LRR) hatte im Vergleich zur 0 h-Kontrolle 12 h bis 72 h pI etwa 2-fach niedrigere mRNA-Kopienzahlen.

Die Transkriptvariante der TLR2b-Genkopie war 12 h pI 3-fach niedriger als bei gesunden Fischen. Die mRNA-Konzentration dieser Variante stieg dann 24 h pI wieder an. Die mRNA der TLR2a-Variante war in der Infektion gar nicht reguliert.

In den übrigen Geweben zeigten sich für keine der Varianten signifikante Unterschiede. durch die vergleichende Expressionsanalyse wurde kein regulatorisches Zusammenspiel der TLR2-Varianten untereinander gefunden.

Tabelle 33 : Infektionsabhängige Expression der *TLR2*-Varianten

Gen	Gewebe	n-fache Veränderung der mRNA-Kopienzahl				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TLR2 LRR	Milz	-1,13 ± 0,16	-1,73 ± 0,32	-1,83 ± 0,39	-1,44 ± 0,14	-1,65 ± 0,25
	Kopfnieren	1,23 ± 0,18	-1,13 ± 0,16	-1,65 ± 0,27	-1,09 ± 0,21	-1,18 ± 0,12
	Leber	-1,01 ± 0,11	-1,10 ± 0,11	-1,01 ± 0,11	1,47 ± 0,30	1,15 ± 0,13
	Thymus	-1,11 ± 0,21	-1,06 ± 0,18	-1,07 ± 0,24	1,15 ± 0,19	1,21 ± 0,18
TLR2a	Milz	-1,10 ± 0,26	-1,25 ± 0,35	-1,45 ± 0,36	-1,07 ± 0,22	-1,29 ± 0,24
	Kopfnieren	1,23 ± 0,35	1,34 ± 0,26	-2,69 ± 0,52	-2,12 ± 0,36	-1,52 ± 0,25
	Leber	-1,13 ± 0,33	-1,38 ± 0,38	-1,05 ± 0,30	-1,38 ± 0,33	-1,24 ± 0,38
	Thymus	1,16 ± 0,14	-1,32 ± 0,21	-1,14 ± 0,21	1,00 ± 0,19	1,25 ± 0,17
TLR2b	Milz	-2,12 ± 0,42	-3,38 ± 0,71	-1,91 ± 0,43	-1,42 ± 0,39	-1,18 ± 0,30
	Kopfnieren	-1,10 ± 0,20	-1,04 ± 0,31	-2,54 ± 0,44	-1,64 ± 0,24	-2,00 ± 0,31
	Leber	1,45 ± 0,52	1,97 ± 0,93	1,83 ± 0,78	1,42 ± 0,57	1,09 ± 0,50
	Thymus	1,37 ± 0,25	-1,17 ± 0,22	1,05 ± 0,24	1,34 ± 0,27	1,30 ± 0,23

Der Verlauf der Expression wird hier durch die n-fachen mRNA-Kopienzahlen zu den Infektionszeitpunkten im Vergleich zu denen der 0 h-Kontrollgruppe dargestellt. Neben dem Induktionsfaktor ist mit einem ± der SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden in fetten Zahlen eingetragen. Signifikante Hochregulierungen wurden rot unterlegt, Abregulation grün.

3.2.2.2 Gewebe-spezifische Expression der PRRs der Regenbogenforelle

Für die Analyse der Gewebe-spezifischen Expression wurden die mRNA-Konzentrationen der 0 h-Kontrollgruppe aus dem Infektionsexperiment genutzt. Pathogen-erkennende Rezeptoren fanden sich in allen untersuchten Geweben (Milz, Kopfnieren, Leber, Thymus). Allerdings waren die mRNA-Konzentrationen im Vergleich der Organe unterschiedlich. Im Mittel waren die Rezeptoren mit $6,01 \times 10^5 \pm 3,57 \times 10^5$ [mRNA-Kopien / μg RNA] am stärksten in der Milz exprimiert. In Kopfnieren ($2,60 \times 10^5 \pm 2,49 \times 10^5$) und Thymus ($1,79 \times 10^5 \pm 1,98 \times 10^5$) waren sie geringer und in der Leber ($7,17 \times 10^4 \pm 1,08 \times 10^5$) am niedrigsten exprimiert. Die mRNA-Konzentrationen der Rezeptoren waren außerdem in den einzelnen Geweben unterschiedlich exprimiert (Abbildung 27). In der Milz hatte TLR21 die höchste mRNA-Konzentration, während TLR5 kaum exprimiert wurde. In der Kopfnieren war der intrazelluläre NOD1 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 1*)-Faktor am stärksten, die TLRs 5, 19 und 22a2 kaum exprimiert. In der Leber zeigten nur

die TLRs 3, 5, 9 und 20 höhere mRNA-Konzentrationen. Im Thymus waren es TLR3, 9, 20 und NOD1.

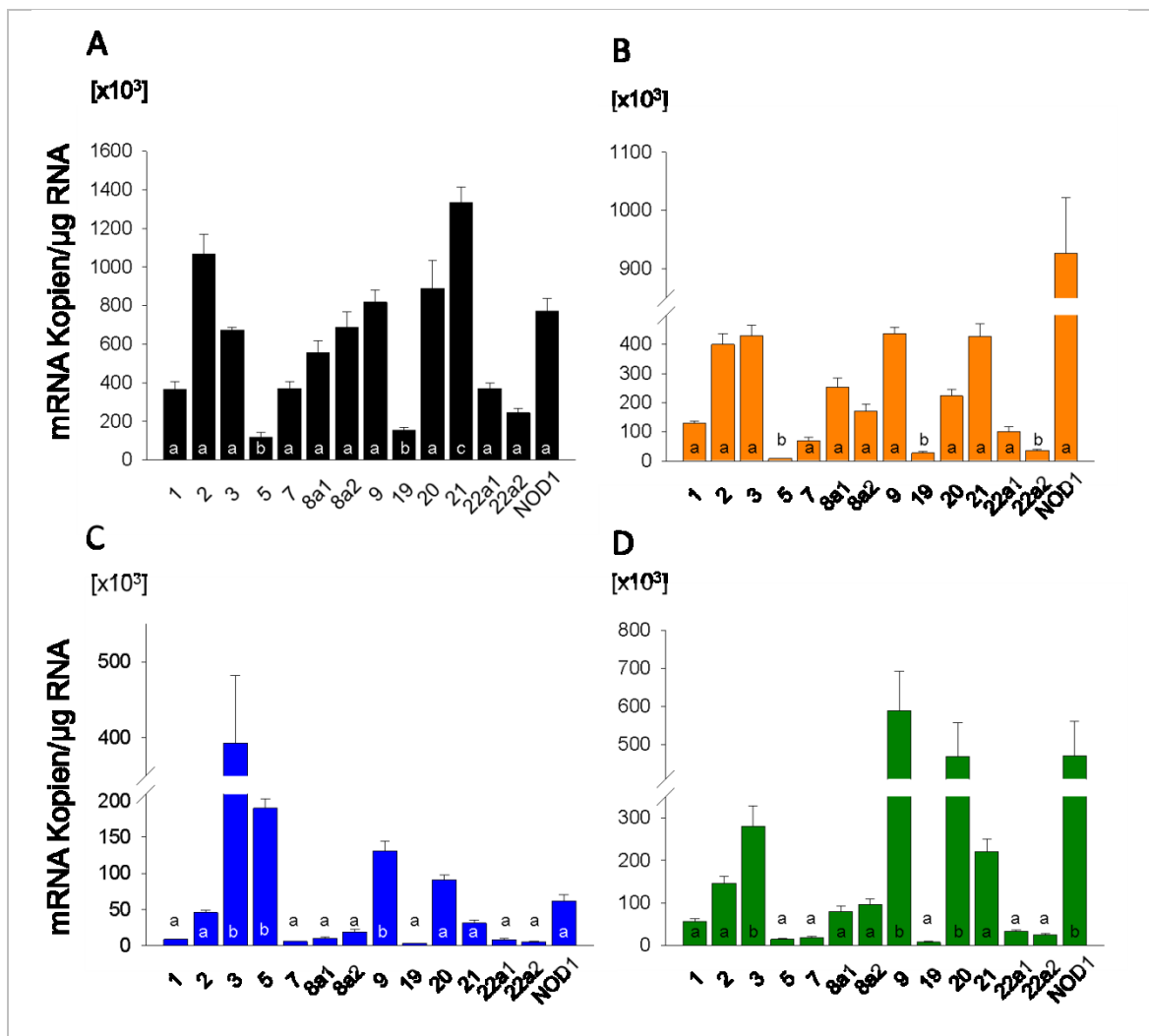


Abbildung 27: Gewebe-spezifische Expression der TLRs und von NOD1

In der Ordinate sind mRNA Kopien je μg RNA in den Geweben A) Milz, B) Kopfnieren, C) Leber und D) Thymus aufgetragen, in der Abszisse die untersuchten PRRs. Alle Zahlen in der Abszisse stehen für ein TLR. NOD1 ist ein intrazellulärer Pathogenrezeptor. Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der gemessenen Gene.

3.2.2.3 Infektionsabhängige Expression der PRRs der Regenbogenforelle

Innerhalb des Infektionsexperimentes analysierten wir 14 PRRs in vier Geweben zu sechs Probenzeitpunkten. Auffällig war, dass die Rezeptoren während der Infektion kaum reguliert wurden. Die Abbildung 28 zeigt alle signifikanten Modulationen der mRNA-Konzentrationen, wenn sie wenigstens 2-fach höher war.

Wenn sich die mRNA-Konzentrationen änderten, dann sanken sie zum überwiegenden Teil im Verlauf der Infektion. Wir fanden insgesamt 37 statistisch signifikante

Veränderungen der mRNA-Konzentration zu den verschiedenen Zeitpunkten und in den verschiedenen Geweben. (19 in der Milz, elf in der Kopfnieren, sieben in der Leber und keine im Thymus).

Bei der Betrachtung der einzelnen Gewebe zeigte sich ein unterschiedliches Verhältnis der Anzahl der regulierten Gene. In der Milz waren von den 14 PRRs acht reguliert (sieben herunterregulierte Gene), in der Kopfnieren fünf (drei herunterregulierte Gene) und in der Leber drei (alle Gene heraufreguliert).

Das Ausmaß der Heraufregulation war beim TLR22a2 in der Kopfnieren (etwa 6-fach höhere mRNA-Konzentration 6 h pI) am höchsten. TLR5 war in der Milz am stärksten herunterreguliert (4-fach 12 h pI).

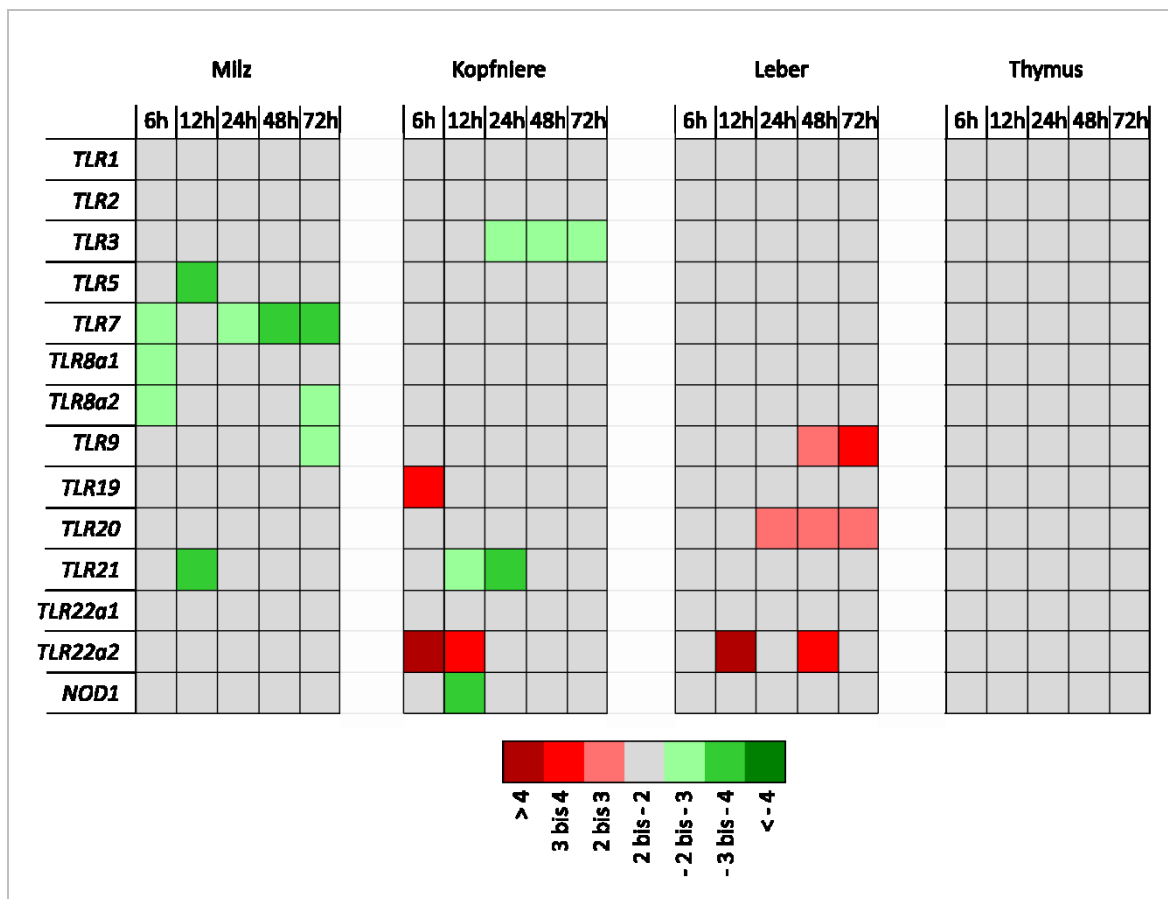


Abbildung 28: Infektionsabhängige Modulation der mRNA-Konzentrationen der TLRs

Die Farben repräsentieren die statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen der mRNA-Konzentrationen, wenn sie mehr als 2-fach höher (Rottöne) oder niedriger (Grüntöne) im Vergleich mit der 0h-Kontrollgruppe waren. Die zu Grunde liegenden Werte sind im Anhang 3.7 und 3.8 gelistet.

TLR5 und TLR21 hatten in der Milz 12 h pI eine 4-fach geringere mRNA-Konzentration im Verhältnis zur 0 h-Kontrollgruppe. TLR7 war 72 h pI 3-fach geringer exprimiert. In der Kopfnieren waren die mRNA-Kopienzahlen der TLRs 22a2 (6-fach) und 19 (3-fach) 6 h pI höher. TLR21 hatte 24 h pI die niedrigste (3-fach) mRNA-

Konzentration. In der Leber waren die signifikant modulierten Faktoren im Verlauf der Infektion alle höher exprimiert, TLR22a2 (4-fach) 12 h pI, TLR20 (2-fach) 48 h pI und TLR9 (3-fach) 72 h pI. Während TLR1 sowie TLR22a1 keine Änderung der Expression während der Infektion zeigten, waren einige zumindest in einem Gewebe um den Faktor 1,5 bis drei verändert (TLR2, 7, 8a1, 8a2, 19, 20 und NOD1). TLR3, 9, 21 und 22a2 zeigten in zwei Geweben Veränderungen der Expression.

In der Zusammenfassung zeigen die Ergebnisse, dass die TLRs kaum reguliert sind und dass eine Heraufregulation von TLRs fast ausschließlich in der Leber stattfindet (Abbildung 28).

3.2.3 Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade

3.2.3.1 Gewebe-spezifische Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade

Für die Analyse der Gewebe-spezifischen Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade wurde, wie bei der Analyse der PRRs, die 0 h-Kontrollgruppe aus dem Infektionsexperiment genutzt. Alle Faktoren waren in allen untersuchten Geweben (Milz, Kopfnieren, Leber, Thymus) exprimiert.

In der Milz war die mittlere Expression der Faktoren mit $2,09 \times 10^6 \pm 2,94 \times 10^6$ [mRNA-Kopien / μg RNA] am höchsten. In der Kopfniere ($1,66 \times 10^6 \pm 2,51 \times 10^6$) und im Thymus ($1,09 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^6$) fanden wir geringere mRNA-Konzentrationen. In der Leber ($2,25 \times 10^5 \pm 2,60 \times 10^5$) waren die Faktoren am wenigsten exprimiert.

Der Adapter MYD88 war in allen vier Geweben immer der am höchsten exprimierte Faktor. Die Faktoren IRAK4a, TRAF6 und TOLLIP waren in den Geweben auf niedrigerem Level exprimiert, aber immer etwa gleich. IRAK1 war mit Ausnahme des Thymus am geringsten exprimiert.

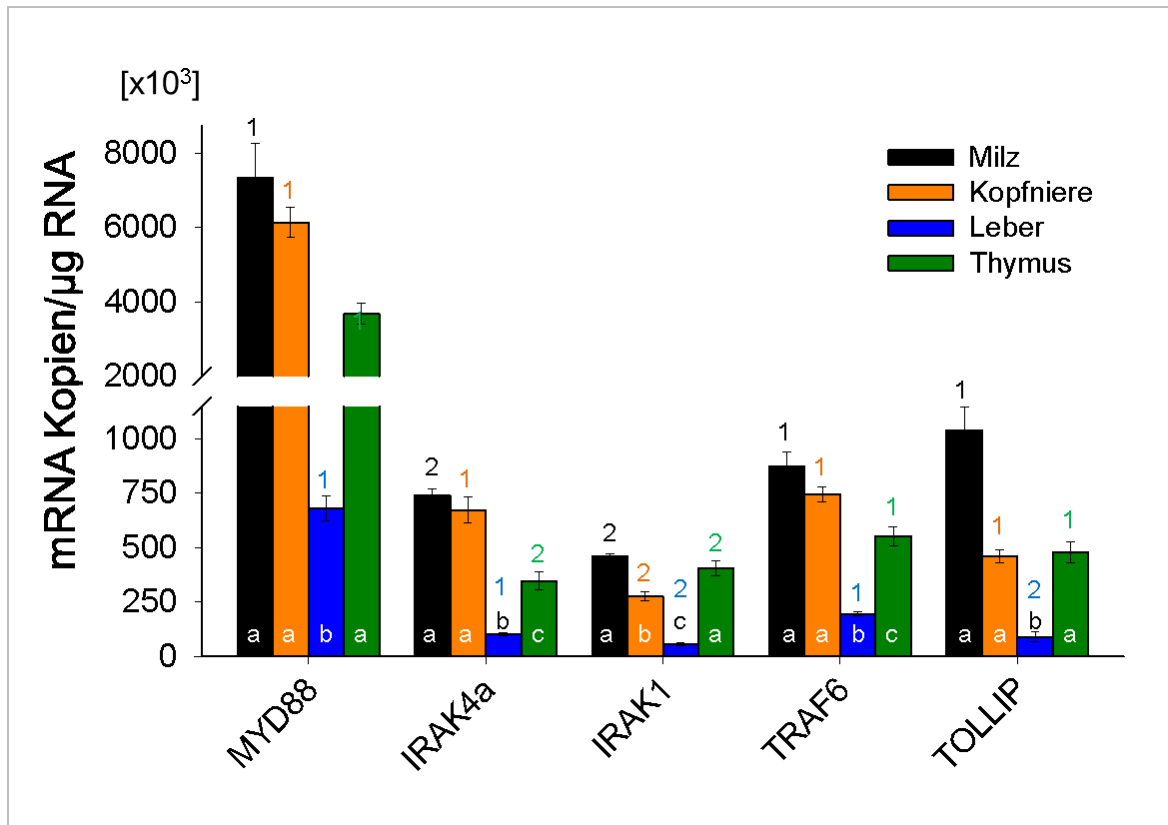


Abbildung 29: Gewebe-spezifische Expression der nachgeschalteten Faktoren

In der Ordinate sind mRNA Kopien je μg RNA aufgetragen, in der Abszisse die untersuchten Faktoren. Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der gemessenen Gene.

A) Milz; B) Kopfnieren; C) Leber; D) Thymus

3.2.3.2 Infektionsabhängige Expression der nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade

Ähnlich wie bei den PRRs war auch die Expression der fünf nachgeschalteten Faktoren der TLR-Signalkaskade kaum reguliert. Im Gegensatz zu diesen waren die nachgeschalteten Faktoren aber stets heraufreguliert. Die meisten signifikanten Regulationen zeigten sich in der Leber (13), in der Kopfniere gab es an drei Messpunkten Veränderungen, in Leber und Thymus zwei (Daten im Anhang 3.8). Die signifikant erhöhten mRNA-Konzentrationen waren im Mittel 3-fach höher. Während ein Großteil der Faktoren um das etwa 3-fache erhöht waren, zeigten sich in der Leber 4,5-fach (TOLLIP, 72 h pI) und fast 7-fach (MYD88, 12 h und 72 h pI) erhöhte mRNA-Konzentration. In der Leber waren sogar alle untersuchten Faktoren zumindest zu einem Zeitpunkt heraufreguliert. Der TLR-Adapter MYD88 war genau wie der Negativregulator TOLLIP nach Infektion ausschließlich in der Leber signifikant erhöht,

IRAK4a in Leber und im Thymus, IRAK1 zu früheren Zeitpunkten in Milz, Kopfnieren und Leber sowie TRAF6 in Kopfnieren, Leber und Thymus.

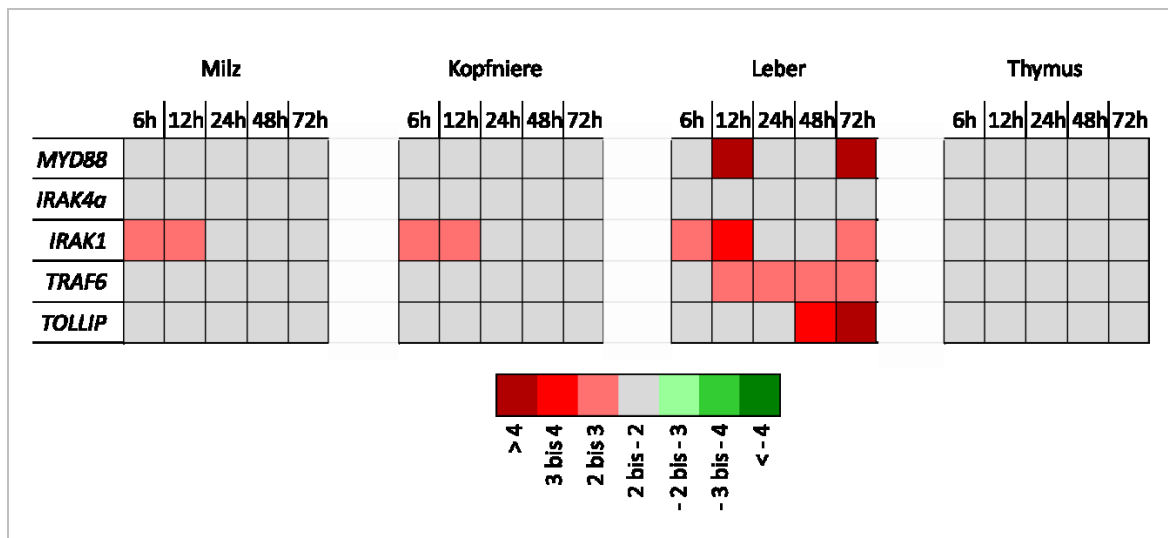


Abbildung 30: Infektionsabhängige Modulation der mRNA-Konzentrationen der nachgeschalteten Faktoren der Signalkaskade

Die Farben repräsentieren die statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen der mRNA-Konzentrationen, wenn sie mehr als 2-fach höher (Rottöne) oder niedriger (Grüntöne) im Vergleich mit der 0h-Kontrollgruppe waren. Die zu Grunde liegenden Werte sind im Anhang 3.7 und 3.8 gelistet.

Die Abbildung 30 zeigt alle signifikanten Modulationen der mRNA-Konzentrationen, wenn sie wenigstens 2-fach höher war, und stellt damit klarer heraus, dass die Leber für die Abwehr von *A. salmonicida* wahrscheinlich eine bedeutende Rolle spielt.

4. Diskussion

4.1 Struktur und Funktion der Schlüsselfaktoren

4.1.1 Der TLR2 der Regenbogenforelle wird wenigstens von einem monoexonischen und einem polyexonischen Gen kodiert

Basierend auf PCR-Ansätze mit degenerierten *Primern* fanden wir zwei *TLR2*-Genvarianten. Die eine Variante (*TLR2a*) zeigte höchste Übereinstimmungen mit den bereits veröffentlichten *TLR2*-Faktoren von diversen Vertebraten. Wie auch bei Mensch, Haushuhn und Krallenfrosch ist der offene Leserahmen des *TLR2a*-Gens nicht durch Introns segmentiert und damit monoexonisch (Abbildung 10). Die ebenfalls isolierte *TLR2a*-cDNA ergibt konzeptionell translatiert ein höchstwahrscheinlich funktionales *TLR2*-Ortholog.

Andere *TLR*-Gene, wie *TLR1* (PALT *et al.*, 2010) und *TLR7* (YANG *et al.*, 2012) sind ausschließlich monoexonisch kodiert, während es für das *TLR3*-Gen (HUANG *et al.*, 2011) nur Beschreibungen von polyexonischen Genen gibt.

Im Genom der Regenbogenforelle wird zumindest ein weiteres *TLR2*-Gen (*TLR2b*) kodiert. Das partiell aufgeklärte *TLR2b*-Gen besteht aus sieben Exons. Die beiden *TLR2*-Genvarianten unterscheiden sich innerhalb des kodierenden Bereiches durch fünf Basenaustausche, von denen zwei nichtsynonym waren.

Bei den Fischen gibt es ebenso viele Beispiele für monoexonische *TLR2*-Faktoren (Zebraäbrbling; MEIJER *et al.*, 2004); Blinder Höhlensalmmler (*Astyanax mexicanus*; ENSAMXT00000026308); und Gefleckter Knochenhecht (*Lepisosteus oculatus*; ENSLOCT00000022362)) wie auch für polyexonischen *TLR2*-Gene (Falscher Heilbutt (*Paralichthys olivaceus*; HIRONO *et al.*, 2004); Japanischen Kugelfisches (ENSTRUT00000007500) und Nil-Maulbrüter (*Oreochromis niloticus*; ENSONIT00000017758)).

Möglicherweise entwickelte sich das monoexonische *TLR2* der Tetrapoden aus einem ursprünglich polyexonischen *TLR2*-Gen. Da bei den Fischen beide *TLR2*-Genvarianten vorkommen, müssen die frühen Vertebraten schon vor der Trennung von Sarcopterygii und Actinopterygii über zwei *TLR2*-Gene verfügt haben. Während die meisten Fische eines der beiden Gene verloren, blieben beide Varianten im Genom der

Regenbogenforelle erhalten. Die *TLR2a*-Genvariante wäre in diesem Fall das wahre Säugerortholog und das *TLR2b*-Gen sein Fisch-spezifisches Paralog.

Das Vorhandensein von funktionalen TLR2-Paralogen im Genom von Vögeln (CORMICAN *et al.*, 2009) unterstützt diese Hypothese. Möglicherweise verlief die Evolution des *TLR4*-Gens ganz ähnlich. Im Genom des Graskarpfen waren, neben einer monoexonischen *TLR4*-Genvariante, noch weitere drei polyexonische Genvarianten kodiert (HUANG *et al.*, 2012a).

Im Verlauf der Sequenzierungsarbeiten für das *TLR2b*-Gen der Regenbogenforelle zeigten sich innerhalb der Introns diverse Sequenzunterschiede (Anhang 3.2). Dies sind Hinweise auf weitere *TLR2*-Gene. Auf Grund der hohen Diversität der Sequenzunterschiede wurde keine weiterführende Sequenzanalyse durchgeführt.

Das TLR2a kodiert nur für einen Bruchteil der TLR2-Transkripte

Neben dem TLR2a-Transkript wurde ein weiteres Transkript gefunden, das sich möglicherweise vom TLR2b-Gen ableitet. Diese ungespleißte TLR2b-Transkriptvariante X1 ergibt in der konzeptionellen Translation allerdings kein sinnvolles Translationsprodukt und ist damit wahrscheinlich ein transkribiertes Pseudogen. Für Mensch, Hund (*Canis lupus familiaris*) und Opossum (*Monodelphis domestica*) wurde bereits beschrieben, dass ein TLR2-Pseudogen und ein funktionales TLR2-Paralog gleichzeitig vorliegen können (ROACH *et al.*, 2005).

Die Analyse der mRNA-Konzentrationen der beiden Varianten unterstützt die Hypothese, dass es neben den zwei isolierten Genen noch weitere Genvarianten und/oder Transkriptvarianten geben muss. Wir ermittelten die mRNA-Konzentration mit einem *Primer*paar, das mutmaßlich alle Varianten erfasste, und verglichen diese mit den Kopienzahlen, die wir durch TLR2a beziehungsweise TLR2b TVX1 diskriminierende *Primer* erhielten. Die ermittelten mRNA-Konzentrationen von TLR2a und der TLR2b TVX1 zusammen machten in keinem Gewebe mehr als 11 % aus. Es muss demzufolge ein oder mehrere weitere TLR2-Transkripte geben. Möglicherweise kodiert auch das polyexonische *TLR2b*-Gen einen funktionalen TLR2-Faktor. Weitere Transkripte können aber auch von weiteren *TLR2*-Genen stammen oder weitere Transkriptvarianten sein. Im Genom des Dorsch (*Gadus morhua*) wurden sogar acht Transkriptvarianten des *TLR22*-Gens gefunden (STAR *et al.*, 2011). Ob es sich bei der TLR2b-Transkriptvariante X1 tatsächlich um ein transkribiertes Pseudogen handelt,

kann nicht hinreichend geklärt werden, da auch die Gewebe-spezifische Expression der beiden Varianten keinen Aufschluss darüber gibt.

4.1.2 Das *TLR2a* der Regenbogenforelle kodiert ein funktionales Transkript

Der TLR2-Faktor ist stark konserviert

Die TLR2-cDNA-Sequenz der Regenbogenforelle war im Vergleich mit verschiedenen Tetrapoden im Mittel zu 56 % identisch (Tabelle 28). Im Vergleich zu TLR2-cDNAs anderer Fischarten war die anteilige Identität nur etwas höher (Zebraquappe, 60 %; Falscher Heilbutt 66 %). Die ähnlichen evolutiven Abstände des Forellen-*TLR2* zu den *TLR2*-Genen der verschiedenen Tetrapoden sowie denen anderer Fischarten sind ein Beleg für die lang andauernde, parallele Entwicklung der Klassen der Actinopterygii und der Sarcopterygii. Die Sequenzvergleiche von TLR3 (HUANG *et al.*, 2011), TLR7 und TLR8 (QIAN *et al.*, 2013) sowie TLR9 (KONGCHUM *et al.*, 2011) bestätigen eine ähnliche Entwicklung bei anderen TLRs.

Weiterhin zeigte der Sequenzvergleich des Forellen-*TLR2* eine höhere Konservierung der intrazellulären TIR-Domäne und eine geringere im Bereich der extrazellulären LRR-Domäne. Dies ist ein Beleg für einen unterschiedlichen Selektionsdruck auf die beiden Domänen. Dieses Phänomen wurde auch für den TLR3- (HUANG *et al.*, 2011) und den TLR9 (KONGCHUM *et al.*, 2011) beschrieben. Während sich die intrazelluläre TIR-Domäne in Koevolution mit den intrazellulären Komponenten entwickelt, muss sich die extrazelluläre LRR-Domäne stetig -den sich verändernden- Liganden anpassen. Der Vergleich der Konservierung der TLR2-Aminosäuresequenzen sowie der entsprechenden cDNA-Sequenz zeigte einen geringeren Konservierungsgrad der Aminosäuresequenz. Dies ist ein Hinweis auf einen positiven Selektionsdruck auf *TLR2*, der auch bereits für anderen TLRs bestimmt wurde (BABIK *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2008; GRUEBER *et al.*, 2014). Dieser positive Selektionsdruck bestätigte sich jedoch bei der mathematischen Analyse der synonymen und nichtsynonymen Nukleotidsubstitutionen nicht (XU *et al.*, 2013).

Ein phylogenetischer Vergleich zeigte, dass sich die *TLR2*-Faktoren der verschiedenen Spezies in dem Stammbaum (Abbildung 13) analog zum allgemein anerkannten Evolutionsstammbaum einordnen. Die gezeigten Verwandtschaftsverhältnisse stimmen

mit denen anderer Autoren überein (QIAN *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass der TLR2a-Faktor tatsächlich ein TLR2-Ortholog ist.

Der TLR2-Faktor wird in Milz und in Immunzellen stark exprimiert

Der erste Ansatz zur Analyse der Gewebe-spezifischen Expression des TLR2-Gens basierte auf den Oligonukleotiden (TLR2_LCf; TLR2_LCr), die in der LRR-Region abgeleitet wurden. Die höchste TLR2-mRNA-Konzentration fand sich in der Milz gefolgt von Kopfniere und Thymus. In der Leber wurde die geringste Konzentration ermittelt.

Die auffällig hohe Expression des TR2 in der Milz wurde auch bei anderem Fischarten (SAMANTA *et al.*, 2012; VARRIALE *et al.*, 2012) beschrieben. Darüber hinaus werden auch viele andere TLRs sehr stark exprimiert (REBL *et al.*, 2007). Die hohen TLR2-mRNA-Konzentrationen in den isolierten Immunzellen (B-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen) zeigen, dass nicht die Epithelzellen der Milz, sondern der hohe Anteil der Immunzellen im Milzgewebe Ursache für die hohen TLR-Konzentrationen sein dürfte. Tatsächlich wurden anatomische Ähnlichkeiten der Fischmilz zur Milz der Säuger nachgewiesen. Die Milz der Teleostei verfügt über lymphatisches Gewebe, analog zur weißen Pulpa der Säuger, in dem Lymphozyten nach Antigen-induzierter Differenzierung proliferieren (URIBE *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde ein hoher Anteil von Lymphozyten am Milzgewebe des Europäischen Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) nachgewiesen (DOS SANTOS *et al.*, 2000). Es gibt weiterhin zahlreiche Studien zur Expression von TLRs in Immunzellen bei Mensch (BUCHTA UND BISHOP, 2014) und Fisch (SCAPIGLIATI, 2013).

TLR2 wird nicht, wie beim Säuger, Infektionsabhängig reguliert

TLR2 wurde im Verlauf der *A. salmonicida*-Infektion nicht reguliert. Lediglich in der Milz waren die TLR2-mRNA-Konzentrationen 12 h, 24 h und 48 h pI etwa 1,7-fach niedriger als im gesunden Fisch.

Dies könnte mit dem leichten Sinken der mRNA-Konzentrationen des T-Zellmarkers TRB 12 h pI einhergehen und damit durch eine Abwanderung von T-Lymphozyten aus der Milz begründet sein. Untersuchungen, in denen verschiedene Fischarten mit anderen gramnegativen Bakterien infiziert wurden, zeigten ganz unterschiedliche Ergebnisse. Eine *Aeromonas hydrophila* Infektion führt bei der Goldbrasse (*Sparus aurata*) zur

Heraufregulation (REYES-BECERRIL *et al.*, 2011), im Großen Gelben Adlerfisch (*Larimichthys crocea*) dagegen zur Herunterregulation (MU *et al.*, 2010). *Edwardsiella tarda* verursachte bei *D. rerio* eine Heraufregulation des TLR2 (YANG *et al.*, 2013), während *Flavobacterium psychrophilum* das TLR2 in der Regenbogenforelle nicht induzierte (LANGEVIN *et al.*, 2012). Beim Säuger wird TLR2 stark infektionsabhängig induziert (YANG *et al.*, 2008). Beim Fisch könnte dieser Faktor demnach auf einer anderen Ebene funktional reguliert werden.

Der TLR2a-Faktor der Regenbogenforelle wird in der HEK293 exprimiert, aktiviert aber nicht den NF- κ B-Transkriptionsfaktor

Neben der TLR2a-Aminosäuresequenz ist auch die 3D-Struktur des Forellenfaktors konserviert. Die Ektodomäne hat eine, für die TLR2-Faktoren der Säuger charakteristische, Hufeisen-förmig angeordnete Tertiärstruktur (LEULIER UND LEMAITRE, 2008), auf der die bekannten Strukturelemente konserviert sind. Daher sollte der Forellen-TLR2a auch in der Lage sein, die klassischen TLR2-Liganden zu erkennen. Die starke Konservierung der TIR-Domäne spricht darüber hinaus für das Gelingen der Rekrutierung der nachgeschalteten Faktoren und damit für eine erfolgreiche Signaltransduktion.

Das Forellen-TLR2a-GFP-Fusionsprotein wurde als Nachweis einer erfolgreichen Expression in der HEK293 exprimiert. Genau wie in menschlichen Zellen (TRIANTAFILOU *et al.*, 2006) sowie in Mauszellen (DIETRICH *et al.*, 2010) lag das Forellen-TLR2a mit Ausnahme des Zellkerns in der gesamten Zelle vor. Ähnlich wurde es auch für das TLR2-Protein des Großen Gelben Adlerfisches (FAN *et al.*, 2015) und auch für das TLR14-Protein, welches genau wie TLR2 zur TLR1-Familie gehört, der Arktischen Lampreite (*Lethenteron camtschaticum*) beschrieben (ISHII *et al.*, 2006).

Als Liganden für die Luciferase-Reportergenanalysen in den HEK293-Zellen wählten wir neben den synthetischen TLR2-Liganden Pam2CSK4, Pam3CSK4 und FSL-1 auch Hitze-getötete *E.coli* Bakterien (Stamm 1303) zur Stimulierung der Zellen. Keiner der Liganden führte zur Aktivierung des Forellenfaktors. Da bisher nur der Säuger-TLR2 von diesen Liganden aktiviert wurde, verwendeten wir in einem darauf folgenden Versuch Hitze getötete *A. salmonicida*. Auch das Fischpathogen führt nicht zu einer Induktion des Reportergens. In einem Versuch, in dem zu einer konstanten Konzentration eines etablierten bovinen TLR2-Konstruktes (YANG *et al.*, 2008) eine

steigende Menge des Forellen-TLR2a-Konstruktes gegeben wurde, zeigte sich eine Dämpfung der NF- κ B-Aktivität der unstimulierten HEK293. Eine Störung der NF- κ B-Homöostase durch einen TLR in unstimulierten Zustand wurde bisher nicht dokumentiert.

Eine Liganden-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors durch Fisch-TLRs wurde bisher nicht dokumentiert

Für keinen einzigen Fisch-TLR konnte bisher eine Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors durch einen spezifischen Liganden nachgewiesen werden. Der Volle-Länge-TLR14 der Arktischen Lamprete, exprimiert in der HEK293, aktivierte NF- κ B nicht, während es mit einer Chimäre aus der Ektodomäne des CD40- (*Cluster of differentiation*) Faktors und der TLR14-TIR-Domäne doch gelang (ISHII *et al.*, 2006). Die lösliche Form des TLR5 (TLR5s) der Regenbogenforelle aktivierte NF- κ B in HeLA-(Henriette Lacks) Zellen nach Flagellin-Stimulation erst nach dem Austausch der Forellen-TIR-Domäne gegen die TIR-Domäne des humanen TLR5 oder nur bei Simultanexpression mit dem vollständigen humanen TLR5 (TSUJITA *et al.*, 2006). Stimulation mit doppelsträngiger RNA führte in HEK293, welche mit dem TLR22 des Japanischen Kugelfisches (*Takifugu rubripes*) transfiziert wurden, zur Aktivierung von Interferon, nicht aber von NF- κ B. Die Aktivierung des Karpfen-TLR2, transfiziert in HEK293, wurde durch den Nachweis der Phosphorylierung der p38-MAPK (p38-Mitogenaktivierte Proteinkinase) gezeigt, aber nicht abschließend durch den Nachweis von aktivierten NF- κ B nachgewiesen. Wohl aber wurde durch Stimulation mit den klassischen TLR2-Liganden eine Reihe von Immungenen in Karpfen-Makrophagen induziert (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Zusammengenommen zeigen diese Beispiele, dass es eine Liganden-spezifische TLR-vermittelte Aktivierung des Immunsystems beim Fisch gibt. Allerdings könnten auch Seitenarme der TLR-Signaltransduktion, die nicht über NF- κ B wirken, die Ursache für die Aktivierung in den genutzten Zellmodellen sein. Ein Beispiel wäre die TICAM1-vermittelte Aktivierung des IRF3- (*Interferon regulatory factor 3*) Transkriptionsfaktors. Dies wäre eine Erklärung für die Liganden-vermittelte TLR22-abhängige Interferon-Induktion in den HEK293, wie sie von MATSUO *et al.*, 2008 berichtet wurde. Weiterhin wurde im Zebraäbärbling gezeigt, dass andere PRRs, wie das

PGRP-SC (*peptidoglycan-recognition protein SC*), andere regulatorische Netzwerke der Immunantwort Liganden-abhängig und ohne NF- κ B aktiviert (CHANG UND NIE, 2008). Da es bisher nicht gelang, eine TLR-abhängige NF- κ B-Aktivierung in irgendeinem Rekonstitutionssystem nachzuweisen, müssen die bisher angewandten Verfahren hinterfragt werden. Die gut konservierte Primärstruktur der meisten Funktionsdomänen der TLRs sowie einer Vielzahl der nachgeschalteten Faktoren der piscinen TLR-Signalkaskade zeigen, dass der prinzipielle Aufbau des TLR-vermittelten Signaltransduktion innerhalb der Vertebraten konserviert ist. Sowohl die Konservierung des I- κ B-Komplexes (LEE *et al.*, 2014), als auch die Bedeutung der NF- κ B-Bindestellen in den Promotoren von diversen immunrelevanten Genen im Fisch (REBL *et al.*, 2010; ZANTE *et al.*, 2015) unterstützten diese Hypothese.

Die molekularen Ursachen für das Scheitern eines Nachweises einer Liganden-abhängigen NF- κ B Aktivierung können nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise liegt es an einer unvollständigen Faltung der überexprimierten, artfremden Faktoren, verursacht durch das Fehlen von entsprechenden Adapter-Proteinen oder Hilfsfaktoren. Beispielsweise ist nur eine der fünf Glykosylierungsstellen des humanen TLR2 im TLR2a der Regenbogenforelle konserviert (Abbildung 12). Die posttranslationale Modifizierung mit Kohlenhydraten ist für die Ausbildung der Sekundärstruktur und damit für die Bindung der Liganden essenziell (WEBER *et al.*, 2004).

Dass die Fisch-TLRs generell nicht in der Lage sind PAMPs zu binden, die als Liganden der Säuger-TLR2 nachgewiesen sind, ist aus den folgenden drei Gründen unwahrscheinlich. Erstens, erschienen die Pathogen-erkennenden TLRs erst vor etwa 500 Mio. Jahren und damit 1,5 Mrd. Jahre nach den ersten PAMPs. Diese Schlüsselstrukturen von Pathogenen sind demnach schon wesentlich länger konserviert. Zweitens ist die Immunantwort von Fischzellen auf PAMPs nachgewiesen. Drittens finden sich konservierte spezifische Aminosäuremotive, von denen die Beteiligung an der Ligandenbindung nachgewiesen ist, in fast jedem piscinen TLR-Faktor. Das TLR2a-Protein der Regenbogenforelle ist in diesem Zusammenhang, genau wie das Säuger-TLR2-Protein, mit dem Bindemotiv für Lipoproteine (L106 bis L114) ausgestattet.

Die Erkennung von Lipopeptiden setzt beim Säuger eine Dimerisierung des TLR2 mit der TLR1 (TAKEUCHI *et al.*, 2001) oder dem TLR6 (TAKEUCHI *et al.*, 2002) voraus. Gerade die Bereiche, die für diese Dimerisierung zuständig sind, zeigen sich im

Vergleich der Aminosäuresequenzen von Regenbogenforelle und Mensch (Abbildung 12) kaum konserviert. Eine fehlerhafte Dimerisierung mit einem der Säugerfaktoren in der HEK293 könnte die Ursache für das Scheitern der Rekonstitution der TLR-Signaltransduktion in der Säugerzelle sein.

4.1.3 Die *IRAK4*-Genstruktur der Salmoniden ist konserviert

Die aus Regenbogenforelle, Atlantischem Lachs und Ostseeschnäpel isolierten Gene konnten eindeutig als *IRAK4*-Gene identifiziert werden. Die *IRAK4*-Genstruktur aller drei Salmoniden weist große Ähnlichkeit zum humanen *IRAK4* auf (Abbildung 18). Am ähnlichsten sind das Lachs- und das humane *IRAK4* arrangiert. Beide Gene verfügen über elf Exons, während die *IRAK4*-Gene von Regenbogenforelle und Ostseeschnäpel durch Exonfusion (Regenbogenforelle: Exon 3 und 4 sowie Exon 8 und 9; Ostseeschnäpel: Exon 8 bis 10) weniger stark segmentiert sind.

Dies sind Hinweise darauf, dass das Lachs- sowie das humane *IRAK4* dem primordialen *IRAK4* gleichen, während sich die *IRAK4*-Gene von Regenbogenforelle und Schnäpel von einer rearrangierten Genkopie ableiten. Beim *MARCH5* (*membrane-associated RING-CH*) -Gen (REBL *et al.*, 2011) wurden ähnliche Übereinstimmungen der Exon-Intron-Segmentierung unter den Arten beschrieben. Beim *PRR13*-Gen (VERLEIH *et al.*, 2010) war diese Segmentierung höchst divers.

Die mit dem Minisatelliten assoziierten flankierenden *direct repeats* im Intron sieben des Regenbogenforellen-*IRAK4* könnten, wie beim Menschen beschrieben (KRAMEROV UND VASSETZKY, 2005), mit der Insertion von Retroposonelementen in Zusammenhang stehen. Es ist allerdings unklar, ob dies für das Forellen-*IRAK4* von Bedeutung ist.

Das Genom der Regenbogenforelle kodiert ein transkribiertes IRAK4-Pseudogen

In der Regenbogenforelle wird neben dem rearrangierten *IRAK4*-Gen auch ein *IRAK4*-Gen (*IRAK4s*) kodiert, das große strukturelle Ähnlichkeit mit dem primordialen *IRAK4*-Gen hat. Insbesondere die Sequenzvergleiche der Introns der *IRAK4*-Gene (Tabelle 31) der drei Salmoniden, aber auch die Ähnlichkeit der Exon-/Intron-Segmentierung des humanen *IRAK4* (Abbildung 18) sowie der Gen-Sequenz-basierte Stammbaum (Abbildung 19) unterstützen diese These. Auch wenn die Genstruktur des *IRAK4s*, genau wie die des *IRAK4* des Lachses, der ursprünglichen Organisation der Gene

entspricht, kodiert es wahrscheinlich kein funktionierendes Protein. Im Gegensatz zu den prototypischen *IRAK4*-Genen ist das *IRAK4s* nur in drei Exons segmentiert und es wird nur ein verkürztes Transkript prozessiert. Weiterhin wurde durch konzeptionelle Translation, unter Verwendung des ersten [ATG]-Codon, kein sinnvoller Leserahmen gefunden. Nur unter Verwendung des [ATG]-Codon an Position 734 bp bis 736 bp ergab sich ein Leserahmen, der für ein verstümmeltes Protein kodieren könnte. Erstaunlicherweise waren die Sequenzen der beiden *IRAK4*-Trankripte der Regenbogenforelle in diesem Bereich 100% identisch. Das daraus resultierende Fehlen eines Selektionsdrucks sollte sich in einem höheren Auseinanderdriften der Gensequenzen zeigen. Die tatsächlich starken Ähnlichkeiten der Gensequenzen könnten darauf hindeuten, dass die Genkopien aus einer nur kurz zurückliegenden Genomduplikation (KOOP UND DAVIDSON, 2008) hervorgegangen sind. Eine andere Erklärung für die hohe Homologie, die gerade im Bereich der C-terminalen Kinasedomäne vorliegen, könnte das Vorhandensein eines unbekannten Selektionsdrucks sein.

Der Vergleich der spezifischen mRNA-Konzentration von *IRAK4* und *IRAK4s* zeigt, dass die funktionale Genkopie in allen Geweben etwa 12-fach stärker exprimiert wird. Auch wenn die *IRAK4s*-cDNA Eigenschaften einer Transkriptvariante zeigt, wird sie in keinem untersuchten Gewebe im höheren Maße exprimiert. Dies wäre ein Hinweis auf eine physiologische Bedeutung eines exprimierten Proteins gewesen. Daraus resultiert, dass es sich beim *IRAK4s*-Gen um ein transkribiertes Pseudogen handelt. Solche transkribierten Pseudogene finden sich auch in anderen Organismen (MEYER UND SCHARTL, 1999) und ihnen werden regulatorische Funktionen auf der mRNA-Ebene zugeordnet (GUO *et al.*, 2014).

4.1.4 Die *Salmoniden* kodieren ein funktionales *IRAK4*-Transkript

Der IRAK4-Faktor ist stark konserviert

Die *IRAK4*-Gesamt-cDNA der Regenbogenforelle und die des Atlantischen Lachs sind zu 94,8 % identisch. Die *IRAK4*-cDNA von Ostseeschnäpels und Regenbogenforelle sind zu 92,5 % identisch (Tabelle 32). Beim Vergleich der *IRAK4*-cDNAs der Salmoniden mit dem anderer Arten fällt auf, dass der Anteil gleicher Nukleotide bei

anderen Fischarten etwa genauso hoch ist, wie beim Vergleich zu Säugern, Vögeln und Amphibien. Aminosäurevergleiche zeigten ein ähnliches Ergebnis.

Dies ist, wie sich auch bei der Analyse des TLR2-Faktors (siehe Punkt 3.1.1.3) zeigt ein Beleg für die lang andauernde parallel verlaufende Evolution von Actinopterygii und Sarcopterygii. Ähnliche Sequenzübereinstimmungen wurden auch für andere Faktoren der TLR-Signalkaskade wie dem Adaptermolekül MyD88 (KONGCHUM *et al.*, 2011) beschrieben. Während der IRAK1-Faktor unter den Arten vergleichsweise weniger stark konserviert war (HUANG *et al.*, 2004; CHAO ZHENG ZHANG *et al.*, 2009), blieben die Nukleotid- beziehungsweise Aminosäuresequenzen des Negativregulators TOLLIP im Laufe der Evolution sogar stärker erhalten (LI *et al.*, 2015).

Die phylogenetische Analyse (Abbildung 20) bestätigt die Ergebnisse der Gen-, cDNA- und Aminosäurevergleiche des IRAK4-Faktors. Die IRAK4-Faktoren der verschiedenen Spezies ordneten sich analog zum allgemein anerkannten Evolutionsstammbaum ein. Weiterhin zeigte die Zuordnung der Invertebraten-IRAK4-Faktoren in die IRAK4-Gruppe, dass sich die vier IRAKs bereits vor der Trennung von *Protostomia* (Urmünder) und *Deuterostomia* (Neumünder) entwickelt haben könnten. In einem bereits publizierten Stammbaum, der alle bis dato bekannten IRAK-Faktoren miteinbezog (GOSU *et al.*, 2012), bestätigen sich die von uns gezeigten Verwandtschaftsverhältnisse.

Die Funktionsabschnitte des IRAK4 unterliegen negativer Selektion

Todes- und Kinasedomäne (LI *et al.*, 2002) können durch den Sequenzvergleich beim IRAK4-Faktor in allen drei Spezies nachgewiesen werden (Anhang 3.4). Diese Funktionsbereiche zeigen einen höheren Konservierungsgrad, als das weniger konservierte Verbindungstück zwischen beiden Domänen.

Das Verhältnis von synonymen zu nichtsynonymen Nukleotidaustauschen spricht für negative Selektion von Todes- ($0,499 \pm 0,056$) und Kinasedomäne ($0,728 \pm 0,043$). Innerhalb des Verbindungsbereiches der beiden Domänen ($0,995 \pm 0,035$) ist die Wahrscheinlichkeit eines synonymen Basenaustausches genauso groß wie für einen nichtsynonymen Austausch.

Die Beobachtung, dass die Kinasedomäne auf der Aminosäureebene bei Lanzettfischen und den Invertebraten weniger konserviert ist als die entsprechende cDNA-Sequenz (Tabelle 32) und die Umkehrung dieses Verhältnisses bei Säugern, Vögeln, Amphibien

und Fischen, lässt vermuten, dass der Selektionsdruck auf die Kinasedomäne im Verlaufe der Evolution nachgelassen hat.

Der IRAK4-Faktor hat sich im Laufe der Evolution verkürzt

Ein interessanter Aspekt des Evolutionsvergleichs des IRAK4-Faktors ist die Verkürzung des Faktors mit steigendem Entwicklungsstand. Die Verkürzung spiegelt möglicherweise einen langfristigen Entwicklungstrend wider, der mit einer funktionalen Optimierung des IRAK4-Faktors im Verlaufe der Evolution einherging und irgendwann im Verlaufe der Vertebratenevolution zum Stillstand gekommen ist.

*IRAK4 wird in Immunorganen stark exprimiert, aber nicht durch Infektion mit *A. salmonicida* induziert*

Die Gewebe-spezifische Expression (Abbildung 21) zeigte, dass IRAK4 in allen untersuchten Geweben exprimiert wurde. In den Geweben Kopfniere, Milz und Körpnere, die bekanntermaßen stark durchblutet sind und Immunzellen produzieren oder beherbergen (URIBE *et al.*, 2011), ist IRAK4 am höchsten exprimiert. In den Geweben, die mit der Umwelt interagieren wie die Kieme und Flosse, fanden sich moderate IRAK4-mRNA-Konzentrationen. In Darm, Fett, Herz, Leber und Muskel war die Expression geringer.

Im Orangegepunkteten Zackenbarsch (*Epinephelus coioides*) und im Gestreiften Schnabelbarsch (*Oplegnathus fasciatus*) wurden ebenfalls hohe IRAK4-mRNA-Konzentrationen in der Kopfniere beschrieben (LI *et al.*, 2014; UMASUTHAN *et al.*, 2015). Allerdings war IRAK4 bei beiden Fischarten in der Milz und der Körpnere weniger stark, in der Leber aber im hohen Maße exprimiert.

In der Regebogenforelle konnte keine infektionsabhängige Regulation der IRAK4-Expression nachgewiesen werden. Zwar ergaben sich nach der Infektion mit *A. salmonicida* in der Leber 24 h und 72 h pI, sowie im Thymus 72 h pI statistisch signifikante Erhöhungen der mRNA-Konzentration, doch waren diese weniger als 2-fach erhöht und damit wahrscheinlich nicht physiologisch bedeutsam. Im Zebrafisch wurden dagegen nach Infektion mit dem ebenfalls gramnegativen Bakterium *Edwardsiella tarda* eine 50-fache Induktion (Leber, 12 h pI) beschrieben (PHELAN *et al.*, 2005). Die Stimulation einer Groppenart (*Trachidermus fasciatus*) mit LPS führte in diversen Geweben zur einer starken Induktion des IRAK4-Gens (LIU *et al.*, 2012). Die

IRAK4-Induktion nach Stimulation mit gramnegativen Bakterien sowie LPS wurde in Untersuchungen im Gestreiften Schnabelbarsch bestätigt (UMASUTHAN *et al.*, 2015). Eine Interpretation dieser unterschiedlichen Beobachtung ist sehr schwer. Physiologisch betrachtet sollte das IRAK4-Protein im ausreichenden Maß in den Zellen vorliegen, um eine umgehende Signaltransduktion bei Pathogenkontakt der Zellen zu gewährleisten. Dies würde eher die Bedeutung einer schnellen Induktion des *IRAK4*-Gens in Frage stellen.

Das IRAK4 der Regenbogenforelle wird in der HEK293 exprimiert und ist an der TLR-Signaltransduktion beteiligt

Auch wenn in der Forelle keine infektionsabhängige Regulation des IRAK4 nachgewiesen werden konnte, lassen die Untersuchungen der zitierten Autoren auf eine Beteiligung des Faktors an der TLR-Signalkaskade der Fische schließen. Untersuchungen an IRAK4-*knockout*-Mäusen zeigten eine starke Schwächung der NF- κ B-Aktivierung sowie der Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine bei Anregung verschiedener TLRs (SUZUKI *et al.*, 2002) und belegen die Beteiligung von IRAK4 bei der Pathogenerkennung der Säuger.

Der Nachweis der erfolgreichen Expression des IRAK4-Faktors (Abbildung 22) erfolgte wie beim TLR2-Faktor (Punkt 3.1.1.7) durch Mikroskopie und Westernblot. Das IRAK4-GFP-Fusionsprotein konnte in der HEK293 im Cytosol nachgewiesen werden. In HeLa-Zellen war das IRAK4-Protein des Orangegepunkteten Zackenbarschs ebenfalls cytosolisch lokalisiert (LI *et al.*, 2014). Auch in anderen Spezies wird das IRAK4 diesem Zellkompartiment zugeordnet (LI *et al.*, 2002).

Sowohl das IRAK4-GFP-Fusionsprotein als auch das native Forellen-IRAK4 hatten in *E.coli*-stimulierten HEK293, nicht wie erwartet einen steigenden Einfluss auf die TLR2-vermittelte NF- κ B-Aktivität, sondern einen hemmenden. Die gute Konservierung des IRAK4-Faktors (BRIETZKE *et al.*, 2014) sowie die erfolgreiche funktionale Integration des Forellen-MyD88 (REBL *et al.*, 2010b) ließen eine Verstärkung der NF- κ B-Aktivierung vermuten.

Eine Erhöhung der IRAK4-Dosis führte zu einer noch stärkeren Reduktion der NF- κ B-Aktivität, bestätigt aber dass der Forellenfaktor in die TLR-Signalkaskade der HEK293 eingreift. In einer später erschienenen Publikation egalisierte die Co-Transfektion von IRAK4 und MyD88 des Orangegepunkteten Zackenbarsches die Erhöhung der NF- κ B-

Aktivität, die durch die Transfektion von ausschließlich MyD88 erreicht wurde (LI *et al.*, 2014).

Möglicherweise ist die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung darauf zurückzuführen, dass das IRAK4-Protein nicht mit allen beteiligten Faktoren des Rezeptorkomplexes kompatibel ist. Dies würde dann zum Abbruch der TLR-Signaltransduktion führen. Sequenzvergleiche zeigten, dass die entscheidenden Motive für die Bindung der Todesdomänen von IRAK4 und MYD88 sowohl in der Regenbogenforelle als auch im Menschen höchst konserviert (BRIETZKE *et al.*, 2014) sind. Die Kontaktstellen für die Bindung des humanen IRAK4 an das nachgeschaltete IRAK2 waren bei der Regenbogenforelle weniger konserviert. Bis heute wurde bei keiner piscinen Spezies IRAK2 nachgewiesen, so dass die TLR-Signaltransduktion bei Fischen wahrscheinlich über IRAK1 gewährleistet wird. Eine fehlerhafte Rekrutierung des humanen IRAK2 an das Forellen IRAK4 könnte somit die Ursache für die Hemmung der NF- κ B-Aktivität nach Stimulation der HEK293 sein.

Kaum erklärbar war die Beobachtung, dass das transfizierte IRAK4 die NF- κ B-Grundaktivierung in den Kontrollzellen herunterregulierte. Dass IRAK4 an der Aufrechterhaltung der NF- κ B-Homöostase beteiligt ist, wurde meines Wissens noch nicht berichtet (relevante Reviews: HAYDEN UND GHOSH, 2011; OECKINGHAUS *et al.*, 2011; SCHEIDEREIT, 2006).

Generelle Probleme bei Rekonstitutionsversuchen von Fisch-Faktoren in der HEK293 wurden bereits unter Punkt 4.1.2 diskutiert. Mögliche Ursachen, wie eine fehlerhafte Proteinfaltung, könnten durch die Entwicklung eines Fischzell-basierten Assays für das TLR-System geprüft werden.

4.2 Expressionsmodulationen der Immunsystem-Faktoren im Verlaufe eine Infektion mit *A. salmonicida*

Die Toll-*like* Rezeptoren haben ihre Hauptfunktion in der Pathogenerkennung und der anschließenden Einleitung einer Immunsystemreaktion nach dem Befall mit Pathogenen. Die Analyse der Gewebe-spezifischen und infektionsabhängigen Expression von parallel, sowie miteinander agierenden Faktoren der TLR-Signalkaskade kann über ihre Rolle bei mikrobieller Gefährdung im Einzelnen aufklären (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014). Wegen des Fehlens von Fisch-spezifischen Antikörpern (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014) fällt die Wahl der

Analysemethode meist auf die wesentlich sensitivere RT-qPCR (VISINTIN *et al.*, 2001). In einer umfassenden Untersuchung konnte eine signifikante und positive Korrelation der mRNA-Konzentration und dem entsprechenden kodierten Protein beim Säuger nachgewiesen werden (SCHWANHÄUSSER *et al.*, 2011).

4.2.1 Die schwere Infektion mit *A. salmonicida* führte zur starken Induktion von Zytokinen

IL1B wird beim Säuger hauptsächlich von Monozyten exprimiert und induziert Fieber (KAMPSCHMIDT, 1984) oder aktiviert Akute-Phase-Proteine in Hepatozyten (MARCH *et al.*, 1985). Die infektionsabhängige Regulation des Zytokins bei der Infektion mit *A. salmonicida* lässt auf eine ähnlich Funktion bei den Salmoniden schließen. In der 0 h-Kontrollgruppe wurde das als Pyrogen aktive (KAMPSCHMIDT, 1984) *IL1B* faktisch nicht exprimiert und war schon 6 h pI induziert. 12 h pI ist es in allen Geweben signifikant hochreguliert. In der hämatopoetischen Kopfniere (PRESS, 1999) war das Gen sogar 400-fach induziert und in der für die Akute-Phase-Reaktion verantwortlichen Leber etwa 150-fach. Eine Vielzahl von Faktoren des zur Akute-Phase-Reaktion zugeordneten Komplementsystems wurde für die Forelle beschrieben (KÖBIS *et al.*, 2015). IL1B war das einzige untersuchte Zytokin, das im dorsoventral von der Kiemenkammer gelegenen Thymus (PRESS, 1999) infektionsabhängig hochreguliert wurde.

TNF wird ebenfalls überwiegend von Monozyten beziehungsweise Makrophagen exprimiert und fördert direkt nach der Pathogenerkennung durch TLRs die Differenzierung von Makrophagen (HEHLGANS AND PFEFFER, 2005) und aktiviert ihre Phagozytose (MURRAY *et al.*, 2005). Im Infektionsexperiment fanden wir *TNF* in den Geweben, die direkt mit dem Peritonealraum assoziiert sind, nach 12 h induziert. In der Leber war *TNF* schon 6 h früher stark induziert. Möglicherweise führt TNF im Fisch, wie im Säuger (MEIJER *et al.*, 1993) zur Induktion von Akute-Phase-Proteinen.

Kommt es zum Kontakt eines Pathogens mit Epithelzellen, exprimieren und sezernieren diese sofort das zu den Botenstoffen zählende IL8 und aktivieren damit die Chemotaxis sowie die Diapedese von neutrophilen Granulozyten (BAGGIOLINI *et al.*, 1989). Im Infektionsexperiment mit *A. salmonicida* zeigte sich eine sehr schnelle Induktion (27-fach in Milz und Kopfniere sowie 60-fach in der Leber) des Faktors in den peritonealen Geweben. Das Ausbleiben der Geninduktion von *IL8* genauso wie *TNF* im Thymus

zeigt, dass in diesem Gewebe keine Makrophagen-Aktivität nötig ist und folglich keine Erreger dorthin gelangen.

Die Induktion von *IL10* in der Kopfniere (54-fach, 12 h pI) ist ein Hinweis auf eine Bedeutung für die Regulation von Immunzellen bei den Fischen. Die pleiotropen Effekte, die *IL10* insbesondere auf verschiedene Leukozyten haben kann, machen eine Interpretation schwierig, auch weil sie bei den Fischen kaum aufgeklärt sind (WEI *et al.*, 2013). Die häufig zitierten immunsuppressiven Funktionen des Faktors, wie die Hemmung der Zytokinsynthese (CONTI *et al.*, 2003) verschiedener Immunzellen, dienen dem Schutz vor Immunpathologie (OBERHOLZER *et al.*, 2002) und sind sicherlich auch für den Fisch von Bedeutung.

Mit der Ausnahme einer marginalen Erhöhung des Transkriptionslevels in der Leber (24 h pI) war das regulatorische *TGFB1* nicht während der Infektion reguliert. Ähnlich wie beim Menschen und im Unterschied zu den anderen untersuchten Zytokinen war das „Haushaltszytokin“ *TGFB1* (LI *et al.*, 2012) auch bei der Forelle im unstimulierten Zustand exprimiert. Möglicherweise wird die Sekretion und Aktivierung von *TGFB1* wie beim Menschen auf der Proteinebene durch seine Assoziation mit den LTBP's (*latency-associated proteins and latent TGFbeta binding proteins*) reguliert (OKLÜ UND HESKETH, 2000).

4.2.2 Die Infektion löste eine Rekrutierung von überwiegend myeloiden Zellen in das Intraperitoneum aus

Die schnelle und starke Rekrutierung von Leukozyten (40-fache Erhöhung der Zellzahl 12 h pI) in das Intraperitoneum zeigt, dass die infizierten Fische heftig auf die Infektion reagierten. Auch wenn die Expression der TLRs und der mit ihnen assoziierten intrazellulären Faktoren kaum reguliert wurde, muss es zur Pathogenerkennung im Peritonealraum gekommen sein. Wäre diese starke Aktivierung der zellulären Immunantwort ausgeblieben, so hätte man die marginale TLR-Regulation als ein Anzeichen für die Entwicklung einer Immuntoleranz gegenüber dem Pathogen deuten können. Die Differenzierung der Immunzellen mit Hilfe der FACS-Methode konnte darüber hinaus belegen, dass gerade die myeloiden Immunzellen (wahrscheinlich Monozyten/Makrophagen und Granulozyten), die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, sehr schnell rekrutiert werden (bereits 6 h pI 43-fach erhöht und ansteigend auf 160-fach 12 h pI). Die lymphoiden Zellen (wahrscheinlich B-Zellen, T-

Zellen und natürliche Killerzellen), die dem adaptiven Arm der Immunabwehr angehören, wurden zwar auch in den Peritonealraum rekrutiert, allerdings mit einem deutlich langsameren Anstieg (41-fach 72 h pI). In einem vergleichbaren Experiment mit 1×10^6 KBE statt 1×10^7 KBE *A. salmonicida* zeigte sich eine ganz ähnliche Zellmigration (KORYTÁŘ *et al.*, 2013). Die unterschiedliche Rekrutierung verursachte veränderte Verhältnisse beider Zelltypen. Von einem anfänglichen 50 zu 50-Verhältnis ausgehend, verschob sich das Verhältnis bereits 6 h pI auf 80 zu 20 zu Gunsten der myeloiden Zellen. Auch wenn die absolute Zellzahl der lymphoiden Zellen im Verlauf der Infektion wieder anstieg, wurde die in der PBS-Kontrollgruppe erhaltene Homöostase von den Fischen nicht wieder hergestellt. Interessanterweise waren zuvor mit inaktivierten *A. salmonicida* behandelte Forellen in der Lage im stärkeren Maße lymphoide Zellen zu rekrutieren und das 80 zu 20-Verhältnis vollständig umzukehren (KORYTÁŘ *et al.*, 2013). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Fische in der Lage sind Endotoxin-Toleranz auszubilden.

4.2.3 T- und B-Zell-Migration erfolgte erst 12 h pI in der Kopfniere

Mit den häufig genutzten zellulären Markern TRB und IgM (BERNARD *et al.*, 2006) untersuchten wir die Migrationsdynamik der lymphoiden Immunzellen, um auch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems nachzuweisen. Beide Faktoren setzen sich aus Untereinheiten zusammen, von denen jeweils eine gewählt und auf der mRNA-Ebene quantifiziert wurde. Die schwere Kette des T-Zell-Rezeptors wird auch bei Fischen ausschließlich von T-Lymphozyten exprimiert (PARTULA *et al.*, 1995), während die schwere Kette des IgM ausschließlich in B-Lymphozyten exprimiert wird (ABÓS *et al.*, 2013). Die quantitativen Untersuchungen spiegeln dabei natürlich nur die Gesamtexpression der Faktoren in den jeweiligen Geweben wieder und lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die Zellzahlen zu.

Im Vergleich zur umgehenden zellulären Antwort des angeborenen Immunsystems dauerte es mehr als 12 h bis die Zellen der B-Typ-Linie aus ihrem Reservoir, der Kopfniere, ins Intraperitoneum auswanderten (11-fach niedrigere IgM-mRNA-Konzentrationen). Im selben Zeitraum wanderten T-Lymphozyten in das Gewebe ein (12-fach höhere TRB-mRNA-Konzentrationen), um möglicherweise mit Antigen-präsentierenden Zellen in Kontakt zu treten. Die signifikanten Schwankungen der beiden Faktoren im Thymus könnten als Auswanderung von T-Lymphozyten oder

Einwanderung von B-Lymphozyten gedeutet werden. Allerdings fielen diese wesentlich geringer (3-fach) aus als in der Kopfniere.

4.2.4 Die Expression der Toll-like-Rezeptoren

Die TLRs sind in Milz und Kopfniere stark exprimiert

Die TLR-mRNA-Konzentrationen insgesamt waren, wie auch bei diversen anderen Fischarten (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014), in der Milz und in der Kopfniere am höchsten und in der Leber auf niedrigerem Niveau. Die Basisexpression der einzelnen TLRs ist in allen Geweben und auch im Vergleich mit anderen Fischarten unterschiedlich (PIETRETTI UND WIEGERTJES, 2014). Auch der Vergleich der Zellmembran-ständigen TLRs (TLR1, -2 und -3) mit den endosomalen TLRs (TLR3, -7, -8a1, -8a2 und -9) oder den Fisch-spezifischen TLRs (TLR19, -20, -21, -22a1 und -22a2), die alle zur TLR11-Familie gehören (AOKI *et al.*, 2013), zeigten keine charakteristischen Muster. Die mRNA-Konzentrationen von NOD1 wurden gemessen um auch einen alternativen PRR zu untersuchen. Auch dieser wurde wie bei anderen Fischarten wie dem Olivgrünem Heilbutt (PARK *et al.*, 2011) in allen untersuchten Geweben exprimiert.

Die TLRs wurden infektionsabhängig eher herunterreguliert

Eine zentrale Fragestellung der Arbeit war es mit Hilfe der infektionsabhängigen Expression im Verlaufe einer *A. salmonicida*-Infektion herauszufinden, welche TLRs an der Erkennung von Pathogenen gramnegativer Bakterien beteiligt sind. Unerwarteter Weise war von den 13 untersuchten TLRs nur *TLR22a2* in der Kopfniere und Leber eindeutig und schnell induziert. Die mRNA-Konzentrationen von TLR9 und TLR20 waren in der Leber in geringem Maße erhöht. Das Transkriptionsniveau von TLR1 und TLR22a1 blieb über den gesamten Zeitraum der Infektion stabil. Die Gene der TLRs -2, -3, -5, -7, -8a1, -8a2, -9, -21 sowie von NOD1 waren in Milz oder Niere sogar herunterreguliert. Die eigentliche Besonderheit der vergleichenden Studie war allerdings, dass die Mehrzahl der TLRs, wenn überhaupt, kaum reguliert war.

Möglicherweise sind die geringen Schwankungen der mRNA-Konzentrationen der einzelnen TLRs nicht durch eine veränderte Genexpression verursacht, sondern sind auf

die Migrationen der unterschiedlichen Immunzellen und damit einer veränderten Zellzusammensetzungen der jeweiligen Gewebe zurückzuführen. Immunzellen des angeborenen (TAKEDA UND AKIRA, 2005) und des adaptiven (ABÓS *et al.*, 2013) Immunsystems exprimieren bekanntermaßen eine ganze Reihe von TLRs. Die nur moderate Regulation der TLR-Gene steht im Gegensatz zu Untersuchungen an anderen Organismen. Bei Säugern (FULLER *et al.*, 2007; OKABAYASHI *et al.*, 2006; TSUJIMOTO *et al.*, 2005), bei Vögeln (CONG *et al.*, 2013) und bei Invertebraten (DEEPIKA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012) wurden ausgeprägte Hochregulationen nach Infektion beschrieben. Darüber hinaus dokumentieren umfangreiche Expressionsanalysen von TLRs auch bei Knochenfischen, wie dem Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*; ZHAO *et al.*, 2013), dem Atlantischen Lachs (ARNEMO *et al.*, 2014) und dem Bullenkopf-Antarktisdorsch (*Notothenia coriiceps*; AHN *et al.*, 2014), eine deutliche Hochregulation bei Infektion mit Parasiten, Bakterien und Viren. Einige der beschriebenen TLR-Gene waren nach Infektion bis zu 10-fach induziert. Die Frage, warum die TLR-Gene überhaupt bei einer Infektion heraufreguliert werden, kann derzeit nicht beantwortet werden. Möglicherweise regulieren die Fische die Pathogen-induzierte NF- κ B-Aktivität nicht, wie die Säuger, durch mRNA-Regulierung der TLRs, sondern auf einer anderen Ebene.

Das TLR22a2-Gen wird von diversen Liganden induziert

Die schnelle und starke Induktion des *TLR22a2*-Gens hebt diesen TLR als einen potentiellen Kandidaten für die Erkennung von *A. salmonicida* hervor. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass dieser TLR-Vertreter diese spezielle Rolle eindeutig einnimmt. Für den TLR22 des Japanischen Kugelfisches wurde die Aktivierung der Zytokinsynthese nach Stimulation mit Viren nachgewiesen (MATSUO *et al.*, 2008). Darüber hinaus zeigte sich in einer ganzen Reihe von Teleostei, dass die Expression des Fisch-spezifischen TLR22 durch eine Vielzahl von Pathogen reguliert wird. Es wurde in verschiedenen Geweben und Zelltypen nach Infektion oder Stimulation heraufreguliert. Nachweise hierfür finden sich bei gramnegativen Bakterien der Gattung *Aeromonas* in Forelle (REBL *et al.*, 2007), Goldfisch (*Carassius auratus*; STAFFORD *et al.*, 2003) und Rohu (SAMANTA *et al.*, 2014), bei *Vibrio anguillarum* in der Goldbrasse (*Sparus aurata*; MUÑOZ *et al.*, 2014), beim grampositiven *Mycobacterium chelonae* im Goldfisch (STAFFORD *et al.*, 2003), bei Retroviren im Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*; LV *et al.*, 2012) und beim Ektoparasiten *Argulus siamensis* im Gemeinen Karpfen

(*Cyprinus carpio*; PANDA *et al.*, 2014). Die Vielzahl an potentiellen Liganden für diesen Faktor deuten darauf hin, dass die Interaktion der TLRs mit den PAMPs möglicherweise nicht wie beim Säuger (MANAVALAN *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2009) mit einem eindeutigen Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniert. Vielleicht dient der TLR22 bei der Forelle zur Erkennung von anderen Liganden wie den endogenen DAMPs, die durch zelluläre Schäden während der *A. salmonicida* Infektion auftreten (INGERSLEV *et al.*, 2010). Interessanterweise ist *TLR22a1* nicht wie sein „Zwillingsgen“ (REBL *et al.*, 2007) *TLR22a2* in der *A. salmonicida* Infektion induziert, obwohl beide Faktoren in der intrazellulären TIR-Domäne fast identisch sind.

4.2.5 Die Expression der nachgeschalteten Faktoren

Die nachgeschalteten Faktoren sind in Milz und Kopfniere stark und in der Leber am schwächsten exprimiert

Die den Rezeptoren nachgeschalteten Faktoren innerhalb der TLR-Signalkaskade MYD88, IRAK4a, IRAK1, TRAF6 und TOLLIP waren, wie auch die TLRs, in der Milz und in der Kopfniere am stärksten exprimiert. Im Thymus waren die mRNA-Konzentrationen der Faktoren ebenfalls hoch, in der Leber waren sie am niedrigsten.

Die niedrigen mRNA-Konzentrationen der nachgeschalteten Faktoren in der Leber stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen einer ganzen Reihe von Faktoren in verschiedenen Fischarten (HUANG *et al.*, 2012; KONGCHUM *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; PHELAN *et al.*, 2005; UMASUTHAN *et al.*, 2015). Hier waren die nachgeschalteten Faktoren in der Leber am höchsten exprimiert und zumeist in Kopfniere und Milz eher gering. Dagegen fanden sich auch Beispiele, bei denen die Basisexpressionen ganz ähnlich waren (REBL *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2009). Warum die Faktoren in den verschiedenen Fischarten in den Geweben so unterschiedlich exprimiert sind, bleibt fraglich. Ihre Aufgabe in der Pathogenerkennung nehmen sie in Immunzellen genauso wahr wie in den Epithelzellen aller Gewebe und Organe

Mit Ausnahme von MYD88, welcher 3- bis 15-fach stärker exprimiert war, hatten die nachgeschalteten Faktoren ähnliche m-RNA-Konzentrationen wie die TLRs. Die hohe Expression des MYD88-Faktors, könnte ein Hinweis drauf sein, dass die TLR-Signaltransduktion bei den Fischen ebenfalls die Formierung des Myddosom-

Komplexes erfordert. Der Proteinkomplex benötigt beim Säuger fünf MyD88-Moleküle.

Die nachgeschalteten Faktoren wurden eher heraufreguliert

Die nachgeschalteten Faktoren waren im Verlauf der *A. salmonicida* Infektion ähnlich den TLRs kaum reguliert. Sie müssen ebenfalls für eine potentielle Infektion sofort für die Rekrutierung an die TLRs zu Verfügung stehen.

Im Unterschied zu den TLRs waren sie, wenn sie reguliert waren, aber eher heraufreguliert. Während im Thymus alle mRNA-Konzentrationen stabil blieben, waren sie in der Leber alle heraufreguliert. Für die meisten Faktoren wurde auch in Säugern (FULLER *et al.*, 2007), Vögeln (LI *et al.*, 2010) und anderen Fischarten (HUANG *et al.*, 2012; WEI *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2009) eine Heraufregulation der Faktoren im Verlauf einer Infektion beschrieben.

Möglicherweise muss das „Depot“ nachgeschalteter Faktoren nach der TLR-Aktivierung aufgefüllt werden, um ihre zweite Funktion in der IL1-Rezeptor1 (IL1R1) vermittelten Signaltransduktion wahrzunehmen zu können. Dieser Rezeptor leitet nach der Bindung an seinen Liganden IL1B (DOWER *et al.*, 1986) die akute Phase-Reaktion ein (MARCH *et al.*, 1985). Die Leber gilt in diesem Zusammenhang, wie in Punkt 4.3.1 beschrieben, als einer der Hauptsyntheseorte für Akute-Phase-Proteinen wie den Komplementsystemfaktoren.

IRAK1 könnte eine zentrale Rolle in der TLR-Signaltransduktion spielen

Die IRAK1-mRNA-Konzentration war bereits 6 h pI neben der Leber auch in der Milz und der Kopfniere erhöht. IRAK1 unterscheidet sich damit von den anderen untersuchten nachgeschalteten Faktoren.

Die frühe Induktion des *IRAK1*-Gens in den Immunorganen gehört bei den Salmoniden somit zu den ersten Ereignissen beim Aufbau einer Immunabwehr (NEUMANN *et al.*, 2007). IRAK1 ist an der Formierung des Myddosoms, das sich um die TIR-Domäne des TLRs aufbaut (LIN *et al.*, 2010), beteiligt. Die infektionsabhängige Rekrutierung des IRAK1-Faktors an die Zellmembran wurde bei einer Virusinfektion beim Graskarpfen gezeigt (HUANG *et al.*, 2012). Als dritter Faktor des Myddosoms könnte IRAK1 limitierend auf die TLR-Signaltransduktion bei den Fischen wirken. Die

verhältnismäßig niedrigen IRAK1-mRNA-Konzentrationen in der gesunden Forelle sowie die Heraufregulation 6 h pI unterstützen diese Hypothese.

Zusätzlich zu diesen Aspekten wurde der Faktor TOLLIP, welcher IRAK1 funktional inaktiviert (BULUT *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2012), 24 h pI signifikant heraufreguliert, um möglicherweise die Synthese von Akute-Phase-Proteinen herunterzufahren. Beide Gesichtspunkte zusammen weisen auf eine zentrale Rolle des IRAK1 auf die Aktivität der TLR-Signaltransduktion der Regenbogenforelle hin.

5. Ausblick

Die Funktionsanalysen der Toll-*like*-Rezeptoren und der nachgeschalteten Faktoren bieten Ansatzpunkte, um anwendungsnahe Grundlagenforschung zu betreiben. Ihre zentrale Bedeutung für die Aktivierung des Immunsystems birgt ein großes Potential für die Entwicklung von Vakzinen und Adjuvantien (KAISHO UND AKIRA, 2002), die in der Aquakultur eingesetzt werden können (SECOMBES, 2008). So könnte beispielsweise die Wirksamkeit solcher Anwendungen im Zellmodell getestet werden. Die funktionalen Untersuchungen am TLR2 der Regenbogenforelle haben allerdings gezeigt, dass es noch einige Hürden auf dem Weg zur Verwirklichung solcher Untersuchungen gibt. Insbesondere gestaltet sich die Expression von Fischgenen in dem etablierten HEK293-System problematisch. Strukturelle Unterschiede der interagierenden Faktoren könnten eine Ursache hierfür sein. Dies würde für die Verwendung von Fischzelllinien sprechen, wenn diese nicht niedrige Wachstumsraten sowie schlechte Transfektionseffizienz aufweisen würden. Wahrscheinlich müssten die TLRs auch in einem möglichst artnahen Zellsystem getestet werden, da die Fische eine sehr große und genetisch heterogene Gruppe sind. Weiterhin sollte ein verwendbares piscines Zellmodell, genau wie die HEK293-Zelllinie, TLRs nur in geringer Zahl und auf niedrigem Niveau exprimieren.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein allgemeiner Beitrag zum Verständnis des Immunsystems der Fische geleistet werden. Im Detail wurde das Gen des Pathogen-erkennenden Rezeptors TLR2 der Regenbogenforelle sowie die Gene des intrazellulären TLR-assoziierten Faktors IRAK4 von Regenbogenforelle, Ostseeschnäpel und Atlantischem Lachs molekulargenetisch analysiert. Vom TLR2 wurden aus der Regenbogenforelle zwei Genvarianten sowie eine Transkriptvariante isoliert. Die Regenbogenforelle exprimiert darüber hinaus neben dem funktionalen *IRAK4*-Gen ein IRAK-Pseudogen. Um die beiden Faktoren umfassend zu charakterisieren, sollte ihre Beteiligung an der Pathogenerkennung analysiert werden. Darüber hinaus wurde die mRNA-Regulation von ausgewählten TLRs und intrazellulären Faktoren der TLR-Signalkaskade im Verlauf einer Infektion mit dem Fischpathogen *A. salmonicida* analysiert.

Das aus dem Genom der Regenbogenforelle isolierte kodierende *TLR2*-Gen wies hohe Homologie zum *TLR2* anderer Vertebraten auf. Genstruktur, Vergleiche von cDNA- und Aminosäuresequenzen sowie ein phylogenetischer Stammbaum bestätigten diese Einordnung. In den funktionalen Untersuchungen konnten die klassischen Liganden des Säuger-*TLR2* nicht den *TLR2* der Regenbogenforelle aktivieren. Als Ursache wurden verschiedene Aspekte wie die Verwendbarkeit der humanen HEK293-Zelllinie und strukturelle Unterschiede von Säuger- und Fisch-Faktoren diskutiert. Der Dosis-abhängige Einfluss auf die Grundaktivität des NF- κ B-Transkriptionsfaktors ist zumindest ein Hinweis auf ein Eingreifen des Faktors in die *TLR*-Signalkaskade im Säugermodell. Neben dem Säugerortholog fanden wir eine zweite *TLR2*-Genvariante, die im Gegensatz zum *TLR2a* in Exons und Introns segmentiert ist. Zusätzlich fanden wir eine Transkriptvariante, die sich möglicherweise vom *TLR2b* ableitet, aber verursacht durch nicht gespleißte Introns zu keinem sinnvollen Proteinprodukt führen kann. Quantitative mRNA-Analysen gaben Hinweise auf eine noch größere Zahl an *TLR2*-Genen sowie Transkriptvarianten.

Analog zur Analyse des *TLR2* Faktors bestätigten Genstruktur, Homologie-Vergleiche und phylogenetischer Stammbaum, dass die drei isolierten *IRAK4*-Gene der Salmoniden Orthologe des Vertebraten *IRAK4* sind. Die Regenbogenforelle transkribiert neben einer vollständigen mRNA auch ein *IRAK4*-Pseudogen. Die Beteiligung des *IRAK4* der Regenbogenforelle konnte, wie auch beim *TLR2*, nur durch eine Dosis-abhängige Hemmung der NF- κ B-Aktivität im Zellmodell gezeigt werden.

Ein Infektionsversuch zeigte, dass das Immunsystem der Regenbogenforelle durch intraperitoneale Applikation von *A. salmonicida* aktiviert wird. Wir konnten eine starke Zytokininduktion und eine umgehende Immunzellmigration nachweisen. Trotz der heftigen Immunsystemreaktion war die Gesamtheit der analysierten *TLRs*, wenn sie überhaupt reguliert waren tendenziell eher herunterreguliert. Der *TLR22a2* war zwar deutlich heraufreguliert, wird aber wahrscheinlich nicht ausschließlich bei Infektion mit gramnegativen Bakterien reguliert. Die nachgeschalteten Faktoren waren, wenn überhaupt, eher heraufreguliert. In der Leber waren sogar alle untersuchten Faktoren heraufreguliert, was möglicherweise durch ihre zusätzliche Beteiligung an der IL1 β -Signaltransduktion begründet werden kann. *IRAK1* war in allen Geweben heraufreguliert und ist damit möglicherweise ein wichtiger regulierender Faktor der Pathogenerkennung der Regenbogenforelle.

Die strukturelle Charakterisierung und die quantitativen Analysen beider Faktoren spiegeln die Komplexität molekulargenetischer Untersuchungen an Salmoniden wider. Insbesondere sollte bei der Interpretation von Analysen der mRNA-Regulation immer bedacht werden, dass zahlreiche funktionale Gen- und Transkriptvarianten sowie transkribierte Pseudogene vorkommen können.

Weiterhin ist die Entwicklung von geeigneten piscinen Zellmodellen notwendig um funktionale Analysen von TLRs und anderen Immunsystemfaktoren untersuchen zu können.

Die infektionsabhängige Regulation der TLRs der Regenbogenforelle zeigte, dass die TLR-Signaltransduktion möglicherweise nicht, wie bei anderen Vertebraten, auf der transkriptionellen, sondern auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert wird.

A Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation geleitet und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn **Professor Dr. Hans-Martin Seyfert**. Er hat diese Dissertation erst ermöglicht und mir alle erdenkliche Unterstützung gegeben, damit ich sie erfolgreich abschließe.

Ich danke der **Deutsche Forschungsgemeinschaft**, die dieses Projekt finanziert hat.

Weiterhin gilt mein Dank Frau **Professor Dr. Renate Horn** von der Universität Rostock, die sich zur Begutachtung meiner Arbeit bereit erklärt hat.

Ich möchte mich ebenfalls bei **PD Dr. Tom Goldammer** bedanken. Er hat mich bei meinen ersten molekularbiologischen Stehversuchen begleitet und mir auch im Verlauf dieser Arbeit ermöglicht, seine Laborausrüstung und auch Probenmaterial zu nutzen.

Besonderer Dank gilt **Dr. Alexander Rebl** für seinen fachlichen Rat, seine Unterstützung bei den Publikationen und die vielen Anregungen zum Verfassen dieser Arbeit. Besonders hat mir sein „angeborenes Motivations-System“ geholfen, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Vielen lieben Dank auch meinen lieben Kollegen **Dr. Marieke Verleih**, **Dr. Judith M. Köbis**, **M.Sc.-Biologe Andreas Borchel**, **Dipl.-Biologin Mareen Nipkow**, die einen großen Anteil an der angenehmen Atmosphäre während unserer gemeinsamen Zeit hatten.

Unseren Projektpartner vom FLI Riems, **Dr. Bernd Köllner** und **Dr. Tomáš Korytář**, danke ich für die Unterstützung bei den gemeinschaftlich durchgeführten Versuchen.

Einen großen Anteil am Gelingen meiner Dissertation haben die Kollegen **Angelika Deike**, **Bärbel Pletz**, **Ingrid Hennings** und **Brigitte Schöpel**, die in allen experimentellen Fragen immer einen Rat und eine helfende Hand hatten. **Marlies Fuchs** danke ich für die Durchführung der Sequenzierungsarbeiten.

Ich möchte ganz besonders den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, meiner lieben Frau **Jana**, die mir immer den Rücken freihält, meinem großen **Emil**, der mich immer auf Trab hält und meiner kleinen **Nora**, die mich morgens stets rechtzeitig aufweckt!!! Weiterhin danke ich meinen **Eltern**, **Schwiegereltern** und **allen anderen Familienmitgliedern**, die mich auf vielfältige Weise unterstützt haben, sehr.

B Literaturverzeichnis

- Abós, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., González, L., Tafalla, C.** (2013). Transcriptional heterogeneity of IgM⁺ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. PLoS One 8, e82737.
- Ahn, D.H., Shin, S.C., Park, H.** (2014). Characterization of Toll-like receptor gene expression and the pathogen agonist response in the antarctic bullhead notothen *Nototothenia coriiceps*. Immunogenetics 66, 563–573.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.** (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 124, 783–801.
- Anders, E.** (1986). Stand der Züchtung und Reproduktion brackwasseradaptierter Regenbogenforellenbestände im Küstenbereich der DDR. Fischerei-Forschung Rostock 24.1.
- Anderson, K. V, Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C.** (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell 42, 791–798.
- Aoki, T., Hikima, J., Hwang, S.D., Jung, T.S.** (2013). Innate immunity of finfish: primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 35, 1689–702.
- Arnemo, M., Kavaliauski, A., Gjøen, T.** (2014). Effects of TLR agonists and viral infection on cytokine and TLR expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Dev. Comp. Immunol. 46, 139–145.
- Babik, W., Dudek, K., Fijarczyk, a., Pabijan, M., Stuglik, M., Szkotak, R., Zieliski, P.** (2014). Constraint and Adaptation in newt Toll-Like Receptor Genes. Genome Biol. Evol. 7, 81–95.
- Baerwald, M., Welsh, A., Hedrick, R., May, B.** (2008). Discovery of genes implicated in whirling disease infection and resistance in rainbow trout using genome-wide expression profiling. BMC Genomics 9:37.
- Baggiolini, M., Walz, a., Kunkel, S.L.** (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J. Clin. Invest. 84, 1045–1049.
- Bassity, E., Clark, T.G.** (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). PLoS One 7, e33196.
- Basto, A.P., Leitão, A.** (2014). Targeting TLR2 for vaccine development. J. Immunol. Res. 2014:619410.
- Bell, J.K., Askins, J., Hall, P.R., Davies, D.R., Segal, D.M.** (2006). The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 8792–8797.
- Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmonczyk, S., Quillet, E., Boudinot, P., Benmansour, A.** (2006). Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. J. Immunol. 176, 3942–3949.

- Boltaña, S., Roher, N., Goetz, F.W., MacKenzie, S.A.** (2011). PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1195–1203.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A.** (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457–472
- Brietzke, A., Goldammer, T., Rebl, H., Korytář, T., Köllner, B., Yang, W., Rebl, A., Seyfert, H.-M.** (2014). Characterization of the interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-encoding gene in salmonid fish: the functional copy is rearranged in *Oncorhynchus mykiss* and that factor can impair TLR signaling in mammalian cells. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 206–14.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M. V, Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., Modlin, R.L.** (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285, 732–736.
- Buchmann, K.** (2014). Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front. Immunol.* 5, 1–8.
- Buchta, C.M., Bishop, G.A.** (2014). Toll-like receptors and B cells: Functions and mechanisms. *Immunol. Res.* 59, 12–22.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., Arditi, M.** (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 s. *J. Immunol.* 167, 987–994.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J., Volpe, F.** (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* 2, 346–351.
- Büssow, K.** (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 32, 81–90.
- Cabal-Hierro, L., Lazo, P.S.** (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell. Signal.* 24, 1297–1305
- Casadei, E., Wang, T., Zou, J., Vecino, J.L., Wadsworth, S., Secombes, C.J.** (2009). Characterization of three novel beta-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Immunol.* 46, 3358–3366.
- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M.P., Six, A., Benmansour, A., Boudinot, R.** (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 644–654.
- Chang, M.X., Nie, P.** (2008). RNAi suppression of zebrafish peptidoglycan recognition protein 6 (zfPGRP6) mediated differentially expressed genes involved in Toll-like receptor signaling pathway and caused increased susceptibility to *Flavobacterium columnare*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 295–301.
- Chen, J.S.C., Wang, T.Y., Tzeng, T. Der, Wang, C.Y., Wang, D.** (2008). Evidence for positive selection in the TLR9 gene of teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 234–242.

- Cong, F., Liu, X., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., Liu, S.** (2013). Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. *BMC Genomics* 14, 743.
- Conti, P., Kempuraj, D., Kandere, K., Di Gioacchino, M., Barbacane, R.C., Castellani, M.L., Felaco, M., Boucher, W., Letourneau, R., Theoharides, T.C.** (2003). IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol. Lett.* 86, 123-129
- Cormican, P., Lloyd, A.T., Downing, T., Connell, S.J., Bradley, D., O'Farrelly, C.** (2009). The avian Toll-Like receptor pathway-Subtle differences amidst general conformity. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 967–973.
- Deepika, a., Sreedharan, K., Paria, A., Makesh, M., Rajendran, K.V.** (2014). Toll-pathway in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) responds to white spot syndrome virus infection: Evidence through molecular characterisation and expression profiles of MyD88, TRAF6 and TLR genes. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 441–454.
- Deguine, J., Barton, G.M.** (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 6, 1–7.
- Di Gioia, M., Zanoni, I.** (2014). Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Mol. Immunol.* 63, 143-52
- Dietrich, N., Lienenklaus, S., Weiss, S., Gekara, N.O.** (2010). Murine Toll-Like Receptor 2 Activation Induces Type I Interferon Responses from Endolysosomal Compartments. *PLoS One* 5, e10250.
- Dos Santos, N.M., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, a E., Rombout, J.H.** (2000). Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 583–596.
- Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S., Urdal, D.L.** (1986). The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* 324, 266–8.
- Fan, Z.-J., Jia, Q.-J., Yao, C.-L.** (2015). Characterization and expression analysis of Toll-like receptor 2 gene in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 129–137.
- FAO,** (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations; Fisheries and Aquaculture Department - Global Production Statistics (Online-Quelle). <http://www.fao.org/fishery/topic/16140/en>.
- FAO,** (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>. S.11
- Fischer, U., Koppang, E.O., Nakanishi, T.** (2013). Teleost T and NK cell immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 197–206.
- Flannery, S., Bowie, A.G.** (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signalling. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1981-1991
- Fuller, C.L., Brittingham, K.C., Porter, M.W., Hepburn, M.J., Petitt, P.L., Pittman, P.R., Bavari, S.** (2007). Transcriptome analysis of human immune responses following live vaccine strain (LVS) *Francisella tularensis* vaccination. *Mol. Immunol.* 44, 3173–3184.

- Gangloff, M., Weber, A.N.R., Gibbard, R.J., Gay, N.J.** (2003). Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and human Toll-like receptor families. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 659–663.
- Gay, N.J., Gangloff, M., O'Neill, L.A.** (2011). What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol.* 32, 104–109.
- Gosu, V., Basith, S., Durai, P., Choi, S.** (2012). Molecular Evolution and Structural Features of IRAK Family Members. *PLoS One* 7, e49771.
- Grinde, B., Jolles, J., Jolles, P.** (1988). Purification and Characterization of 2 Lysozymes from Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*). *Eur. J. Biochem.* 173, 269–273.
- Grueber, C.E., Wallis, G.P., Jamieson, I.G.** (2014). Episodic positive selection in the evolution of avian toll-like receptor innate immunity genes. *PLoS One* 9, e89632.
- Guo, X., Lin, M., Rockowitz, S., Lachman, H.M., Zheng, D.** (2014). Characterization of human pseudogene-derived non-coding RNAs for functional potential. *PLoS One* 9, e93972.
- Hardie, L.J., Laing, K.J., Daniels, G.D., Grabowski, P.S., Cunningham, C., Secombes, C.J.** (1998). Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: Analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine* 10, 555–563.
- Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Kriks, F., Kirikae, T., Goetz, F.** (2006). Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 177, 3162–3169.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, a, Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.
- Hayden, M.S., Ghosh, S.** (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 21, 223–244.
- Hehlmann, T., Pfeffer, K.** (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20.
- Hirono, I., Takami, M., Miyata, M., Miyazaki, T., Han, H.J., Takano, T., Endo, M., Aoki, T.** (2004). Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* 56, 38–46.
- Hoffmann, J.A.** (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* (80-). 284, 1313–1318.
- Huang, R., Dong, F., Jang, S., Liao, L., Zhu, Z., Wang, Y.** (2012). Isolation and analysis of a novel grass carp toll-like receptor 4 (tlr4) gene cluster involved in the response to grass carp reovirus. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 383–388.
- Huang, R., Lv, J., Luo, D., Liao, L., Zhu, Z., Wang, Y.** (2012). Identification, characterization and the interaction of Tollip and IRAK-1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Shellfish Immunol.* 33, 459–467.
- Huang, X.N., Wang, Z.Y., Yao, C.L.** (2011). Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 98–106.

- Huang, Y., Li, T., Sane, D.C., Li, L.** (2004). IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *J.Biol.Chem.* 279, 51697–51703.
- Huxford, T., Ghosh, G.** (2009). A Structural Guide to Proteins of the NF-kappa B Signaling Module. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1, a000075.
- Ingerslev, H.C., Lunder, T., Nielsen, M.E.** (2010). Inflammatory and regenerative responses in salmonids following mechanical tissue damage and natural infection. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 440–450.
- Inoue, Y., Kamota, S., Ito, K., Yoshiura, Y., Ototake, M., Moritomo, T., Nakanishi, T.** (2005). Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 335–344.
- Ishii, a., Matsuo, a., Sawa, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Seya, T.** (2006). Lamprey TLRs with Properties Distinct from Those of the Variable Lymphocyte Receptors. *J. Immunol.* 178, 397–406.
- Janssens, S., Beyaert, R.** (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell* 11, 293–302.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., Lee, J.O.** (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071–1082.
- Kaisho, T., Akira, S.** (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1589, 1-13
- Kampschmidt, R.F.** (1984). The numerous postulated biological manifestations of interleukin-1. *J. Leukoc. Biol.* 36, 341–355.
- Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G., Lee, J.O.** (2009). Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* 31, 873–884.
- Karin, M., Lin, A.** (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–7.
- Kawai, T., Akira, S.** (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kawai, T., Akira, S.** (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem.* 141, 137–145.
- Keestra, a M., de Zoete, M.R., Bouwman, L.I., van Putten, J.P.M.** (2010). Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *J. Immunol.* 185, 460–467.
- Köbis, J.M., Rebl, A., Kühn, C., Korytář, T., Köllner, B., Goldammer, T.** (2015). Comprehensive and comparative transcription analyses of the complement pathway in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 98–107.
- Kongchum, P., Hallerman, E.M., Hulata, G., David, L., Palti, Y.** (2011). Molecular cloning, characterization and expression analysis of TLR9, MyD88 and TRAF6 genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol.* 30, 361–371.

- Koop, B.F., Davidson, W.S.** (2008). Genomics and the Genome Duplication in Salmonids. *Fish. Global Welf. Environ.* 77–86.
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., Goldammer, T., Köllner, B.** (2013). Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1192–9.
- Kramerov, D. a., Vassetzky, N.S.** (2005). Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int. Rev. Cytol.* 247, 165–221.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G.** (2007). Toll-like receptor signal transduction 39, 421–438.
- Laing, K.J., Wang, T.H., Zou, J., Holland, J., Hong, S.H., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., Secombes, C.J.** (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *Eur. J. Biochem.* 268, 1315–1322.
- Laing, K.J., Zou, J.J., Wang, T.H., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., Secombes, C.J.** (2002). Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 433–444.
- Langevin, C., Blanco, M., Martin, S. a M., Jouneau, L., Bernardet, J.F., Houel, A., Lunazzi, A., Duchaud, E., Michel, C., Quillet, E., Boudinot, P.** (2012). Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One* 7, e39126.
- Lauw, F.N., Caffrey, D.R., Golenbock, D.T.** (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* 26, 509–511
- Le Friec, G., Kemper, C.** (2009). Complement: coming full circle. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 57, 393–407.
- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P.** (1998). Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.* 201, 165–168.
- Lee, P.T., Zou, J., Holland, J.W., Martin, S. a M., Collet, B., Kanellos, T., Secombes, C.J.** (2014). Identification and characterisation of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 41, 549–559.
- Lee, Y., Umasuthan, N., Whang, I., Revathy, K.S., Lee, S., De Zoysa, M., Oh, C., Kang, D.-H., Noh, J.K., Lee, J.** (2014). Two NF- κ B inhibitor- α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) genes from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular characterization, genomic organization and mRNA expression analysis after immune stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 633–642.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A.** (1997). *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14614–14619.
- Leong, J.S., Jantzen, S.G., von Schalburg, K.R., Cooper, G.A., Messmer, A.M., Liao, N.Y., Munro, S., Moore, R., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Davidson, W.S., Koop, B.F.** (2010). *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics* 11:279.
- Leulier, F., Lemaitre, B.** (2008). Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* 9, 165–178.

- Li, M., Wang, Q. long, Lu, Y., Chen, S. lin, Li, Q., Sha, Z. Xia** (2012). Expression profiles of NODs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and channel catfish hemorrhage reovirus. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1033–1041.
- Li, P., Xia, P., Wen, J., Zheng, M., Chen, J., Zhao, J., Jiang, R., Liu, R., Zhao, G.** (2010). Up-regulation of the MyD88-dependent pathway of TLR signaling in spleen and caecum of young chickens infected with *Salmonella* serovar Pullorum. *Vet. Microbiol.* 143, 346–351
- Li, S.Y., Strelow, A., Fontana, E.J., Wesche, H.** (2002). IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5567–5572.
- Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., Wang, H., Yang, X.F.** (2012). IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine - a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* 7, e33628.
- Li, Y.W., Mo, X.B., Zhou, L., Li, X., Dan, X.M., Luo, X.C., Li, A.X.** (2014). Identification of IRAK-4 in grouper (*Epinephelus coioides*) that impairs MyD88-dependent NF- κ B activation. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 190–197.
- Li, Y.-W., Wang, Z., Mo, Z.-Q., Li, X., Luo, X.-C., Dan, X.-M., Li, A.-X.** (2015). Grouper (*Epinephelus coioides*) MyD88 and Tollip: Intracellular localization and signal transduction function. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 153–158.
- Liaunardy-Jopeace, A., Gay, N.J.** (2014). Molecular and Cellular Regulation of Toll-Like Receptor-4 Activity Induced by Lipopolysaccharide Ligands. *Front. Immunol.* 5, 1–5.
- Lin, S.C., Lo, Y.C., Wu, H.** (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–892.
- Lv, J., Huang, R., Li, H., Luo, D., Liao, L., Zhu, Z., Wang, Y.** (2012). Cloning and characterization of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Toll-like receptor 22 gene, a fish-specific gene. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 1022–1031.
- Magnadottir, B.** (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151.
- Manavalan, B., Basith, S., Choi, S.** (2011). Similar structures but different roles-an updated perspective on TLR structures. *Front. Physiol.* JUL, 1–13.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K.** (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641–647.
- Maribus GGmbH & The International Ocean Institute** (2013). World Ocean Review - Mit den Meeren leben 2013. http://worldoceanreview.com/wp-content/downloads/wor1/WOR1_gesamt.pdf. Kapitel 6, S. 120-129
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M., Seya, T.** (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181, 3474–3485.

- Meijer, A.H., Krens, S.F.G., Rodriguez, I.A.M., He, S.N., Bitter, W., Snaar-Jagalska, B.E., Spaik, H.P.** (2004). Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.* 40, 773–783.
- Meijer, C., Huysen, V., Smeenk, R.T., Swaak, A.J.** (1993). Profiles of cytokines (TNF alpha and IL-6) and acute phase proteins (CRP and alpha 1AG) related to the disease course in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2, 359–65.
- Meyer, A., Schartl, M.** (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 699–704.
- Mitra, A., Foster-Frey, J., Rexroad, C.E., Wells, K.D., Wall, R.J.** (2003). Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence of gene duplication. *Anim. Biotechnol.* 14, 7–12.
- Mitsuzawa, H., Wada, I., Sano, H., Iwaki, D., Murakami, S., Himi, T., Matsushima, N., Kuroki, Y.** (2001). Extracellular Toll-Like Receptor 2 Region Containing Ser 40-Ile64 but Not Cys30-Ser39 Is Critical for the Recognition of *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 276, 41350–41356.
- Mu, Y., Ding, F., Cui, P., Ao, J., Hu, S., Chen, X.** (2010). Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection. *BMC Genomics* 11:506.
- Muñoz, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., Mulero, V.** (2014). Toll-like receptor 22 of gilthead seabream, *Sparus aurata*: Molecular cloning, expression profiles and post-transcriptional regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 173–179.
- Murray, R.Z., Kay, J.G., Sangermani, D.G., Stow, J.L.** (2005). A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 310, 1492–1495.
- Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T.K., Somamoto, T.** (2011). The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1296–1308.
- Nelson, J.S.** (2006). *Fishes of the World*. Kapitel Phylum Chordata, S20
- Neumann, D., Kollwe, C., Pich, A., Cao, P., Resch, K., Martin, M.U.** (2008). Threonine 66 in the death domain of IRAK-1 is critical for interaction with signaling molecules but is not a target site for autophosphorylation. *J. Leukoc. Biol.* 84, 807–813.
- Neumann, D., Kollwe, C., Resch, K., Martin, M.U.** (2007). The death domain of IRAK-1: An oligomerization domain mediating interactions with MyD88, Tollip, IRAK-1, and IRAK-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 1089–1094.
- Nikov, K., Smolka, S.** (2003). Vorstudie im Kontext Chemikalieneinsatz in der Aquakultur. www.pan-Germany.org/download/aquakultur_1.pdf. Kapitel 7, S. 36-37
- O'Neill, L. a J., Golenbock, D., Bowie, A.G.** (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–60.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawer, L.L.** (2002). Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.* 30, S58–S63.

- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S.** (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708.
- Oehlenschläger, J.** (2010). Fischerei-Erzeugnisse weltweit - Herkunft, Qualität, Sicherheit. *Ernährungsumschau* 09/2010. <https://www.ernaehrungs-umschau.de/print-artikel/13-09-2010-special-fischerei-erzeugnisse-weltweit-herkunft-qualitaet-sicherheit/>. S. 490ff.
- Okabayashi, T., Kariwa, H., Yokota, S., Iki, S., Indoh, T., Yokosawa, N., Takashima, I., Tsutsumi, H., Fujii, N.** (2006). Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J Med Virol* 78, 417–424.
- Oklü, R., Hesketh, R.** (2000). The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem. J.* 352 Pt 3, 601–610.
- Oshiumi, H., Matsuo, A., Matsumoto, M., Seya, T.** (2008). Pan-Vertebrate Toll-Like Receptors During Evolution. *Curr. Genomics* 9, 488–493.
- Palti, Y., Rodriguez, M.F., Gahr, S.A., Purcell, M.K., Rexroad III, C.E., Wiens, G.D.** (2010). Identification, characterization and genetic mapping of TLR1 loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 28, 918–926.
- Panda, R.P., Chakrapani, V., Patra, S.K., Saha, J.N., Jayasankar, P., Kar, B., Sahoo, P.K., Barman, H.K.** (2014). First evidence of comparative responses of Toll-like receptor 22 (TLR22) to relatively resistant and susceptible Indian farmed carps to *Argulus siamensis* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 25–35.
- Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.-S., Lee, H., Lee, J.-O.** (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–1195.
- Park, S. Bin, Hikima, J.-I., Suzuki, Y., Ohtani, M., Nho, S.W., Cha, I.S., Jang, H. Bin, Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Jung, T.S.** (2011). Molecular cloning and functional analysis of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 680–687.
- Partula, S., de Guerra, A., Fella, J.S., Charlemagne, J.** (1995). Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 155, 699–706.
- Phelan, P.E., Mellon, M.T., Kim, C.H.** (2005). Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Immunol.* 42, 1057–1071.
- Pietretti, D., Wiegertjes, G.F.** (2014). Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 205–222.
- Pleguezuelos, O., Zou, J., Cunningham, C., Secombes, C.J.** (2000). Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 51, 1002–1011.
- Press, C.** (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318.
- Qian, T., Wang, K., Mu, Y., Ao, J., Chen, X.** (2013). Molecular characterization and expression analysis of TLR 7 and TLR 8 homologs in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 671–679.

- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S.** (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148, 23–33.
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.M.** (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 139–150.
- Rebl, A., Hoyheim, B., Fischer, U., Kollner, B., Siegl, E., Seyfert, H.M.** (2008). Tollip, a negative regulator of TLR-signalling, is encoded by twin genes in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 153–162.
- Rebl, A., Köbis, J.M., Fischer, U., Takizawa, F., Verleih, M., Wimmers, K., Goldammer, T.** (2011). MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1041–1050.
- Rebl, A., Rebl, H., Korytář, T., Goldammer, T., Seyfert, H.M.** (2014). The proximal promoter of a novel interleukin-8-encoding gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is strongly induced by CEBPA, but not NF- κ B p65. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 155–164.
- Rebl, A., Rebl, H., Liu, S., Goldammer, T., Seyfert, H.M.** (2010). Salmonid Tollip and MyD88 factors can functionally replace their mammalian orthologues in TLR-mediated trout SAA promoter activation. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 81–87.
- Rebl, A., Siegl, E., Kollner, B., Fischer, U., Seyfert, H.M.** 2007. Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced expression by *Aeromonas salmonicida*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 499–510.
- Reyes-Becerril, M., López-Medina, T., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.Á.** (2011). Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 564–570.
- Ribeiro, C.M.S., Hermsen, T., Taverne-Thiele, A.J., Savelkoul, H.F.J., Wiegertjes, G.F.** (2010). Evolution of Recognition of Ligands from Gram-Positive Bacteria: Similarities and Differences in the TLR2-Mediated Response between Mammalian Vertebrates and Teleost Fish. *J. Immunol.* 184, 2355–2368.
- Ringwood, L., Li, L.W.** (2008). The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* 42, 1–7.
- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., Aderem, A.** (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9577–9582.
- Roach, J.M., Racioppi, L., Jones, C.D., Masci, A.M.** (2013). Phylogeny of Toll-Like Receptor Signaling: Adapting the Innate Response. *PLoS One* 8, e54156.
- Rombout, J.H.W.M., Huttenhuis, H.B.T., Picchiatti, S., Scapigliati, G.** (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 441–455.
- Samanta, M., Swain, B., Basu, M., Mahapatra, G., Sahoo, B.R., Paichha, M., Lenka, S.S., Jayasankar, P.** (2014). Toll-Like Receptor 22 in *Labeo rohita*: Molecular Cloning, Characterization, 3D Modeling, and Expression Analysis Following Ligands Stimulation and Bacterial Infection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 309–327.

- Samanta, M., Swain, B., Basu, M., Panda, P., Mohapatra, G.B., Sahoo, B.R., Maiti, N.K.** (2012). Molecular characterization of toll-like receptor 2 (TLR2), analysis of its inductive expression and associated down-stream signaling molecules following ligands exposure and bacterial infection in the Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 411–425.
- Scapigliati, G.** (2013). Functional aspects of fish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 200–208
- Scheidereit, C.** (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685–6705.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.
- Secombes, C.** (2008). Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish Shellfish Immunol.* 25, 409–16
- Secombes, C.J., Bird, S., Cunningham, C., Zou, J.** (1999). Interleukin-1 in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 335–343.
- Seya, T., Matsumoto, M., Ebihara, T., Oshiumi, H.** (2009). Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Rev.* 227, 44–53
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Assoian, R.K.** (1986). Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* (80-). 233, 532–534.
- Stafford, J.L., Ellestad, K.K., Magor, K.E., Belosevic, M., Magor, B.G.** (2003). A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 685–698.
- Star, B., Nederbragt, A.J., Jentoft, S., Grimholt, U., Malmstrom, M., Gregers, T.F., Rounge, T.B., Paulsen, J., Solbakken, M.H., Sharma, A., Wetten, O.F., Lanzen, A., Winer, R., Knight, J., Vogel, J.H., Aken, B., Andersen, O., Lagesen, K., Tooming-Klunderud, A., Edvardsen, R.B., Tina, K.G., Espelund, M., Nepal, C., Previti, C., Karlsen, B.O., Moum, T., Skage, M., Berg, P.R., Gjoen, T., Kuhl, H., Thorsen, J., Malde, K., Reinhardt, R., Du, L., Johansen, S.D., Searle, S., Lien, S., Nilsen, F., Jonassen, I., Omholt, S.W., Stenseth, N.C., Jakobsen, K.S.** (2011). The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature* 477, 207–210.
- Sunyer, J.O.** (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat. Immunol.* 14, 320–326.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S.Y., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W., Yeh, W.C.** (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750–754.
- Swain, B., Basu, M., Samanta, M.** (2013). NOD1 and NOD2 receptors in mrigal (*Cirrhinus mrigala*): Inductive expression and downstream signalling in ligand stimulation and bacterial infections. *J. Biosci.* 38, 533–548.
- Takeda, K., Akira, S.** (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.

- Takeda, K., Takeuchi, O., Akira, S.** (2002). Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 8, 459–463.
- Takeuchi, O., Akira, S.** (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mührladt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S.** (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13, 933–940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., Akira, S.** (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10–14.
- Triantafilou, M., Gamper, F.G.J., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T., Triantafilou, K.** (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 281, 31002–31011.
- Tsujimoto, H., Ono, S., Majima, T., Kawarabayashi, N., Takayama, E., Kinoshita, M., Seki, S., Hiraide, H., Moldawer, L.L., Mochizuki, H.** (2005). Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 23, 39–44.
- Tsujita, T., Ishii, A., Tsukada, H., Matsumoto, M., Che, F.S., Seya, T.** (2006). Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24, 2193–2199.
- Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T.** (2004). Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J. Biol. Chem.* 279, 48588–48597.
- Umasuthan, N., Bathige, S.D.N.K., Whang, I., Lim, B.-S., Choi, C.Y., Lee, J.** (2015). Insights into molecular profiles and genomic evolution of an IRAK4 homolog from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Immunogen- and pathogen-induced transcriptional expression. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 436–448.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G.** (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha).* 56, 486–503.
- Vallabhapurapu, S., Karin, M.** (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733.
- Varriale, S., Ferrareso, S., Giacomelli, S., Coscia, M.R., Bargelloni, L., Oreste, U.** (2012). Evolutionary analysis of Antarctic teleost Toll-like receptor 2. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1076–1085.
- Verleih, M., Rebl, A., Köllner, B., Korytář, T., Kotterba, G., Anders, E., Wimmers, K., Goldammer, T.** (2010). Molecular characterization of PRR13 and its tissue-specific expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 1271–1276.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., Segal, D.M.** (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 249–255.
- Wang, J., Shao, Y., Bennett, T. a., Shankar, R. a., Wightman, P.D., Reddy, L.G.** (2006). The functional effects of physical interactions among toll-like receptors 7, 8, and 9. *J. Biol. Chem.* 281, 37427–37434.

- Wang, P.-H., Liang, J.-P., Gu, Z.-H., Wan, D.-H., Weng, S.-P., Yu, X.-Q., He, J.-G.** (2012). Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Sp& auml; tzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 359–371.
- Wang, W., Asim, M., Yi, L., Hegazy, A., Hu, X., Zhou, Y., Ai, T., Lin, L.** (2015). Abortive Infection of Snakehead Fish Vesiculovirus in ZF4 Cells Was Associated with the RLRs Pathway Activation by Viral Replicative Intermediates. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6235–6250.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M.** (2001). Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79, 570–574.
- Weber, A.N.R., Morse, M. a., Gay, N.J.** (2004). Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J. Biol. Chem.* 279, 34589–34594.
- Wei, H., Yang, M., Zhao, T., Wang, X., Zhou, H.** (2013). Functional expression and characterization of grass carp IL-10: An essential mediator of TGF- β 1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes. *Mol. Immunol.* 53, 313–320.
- Wei, J., Guo, M., Gao, P., Ji, H., Li, P., Yan, Y., Qin, Q.** (2014). Isolation and characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) from grouper, *Epinephelus tauvina*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 61–68.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perović-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., Müller, W.E.G.** (2007). Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* 24, 792–804.
- Xu, T., Meng, F., Zhu, Z., Wang, R.** (2013). Characterization and comprehensive analysis of the miiuy croaker TLR2 reveals a direct evidence for intron insert and loss. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 119–128.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S.** (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668–6672.
- Yang, C., Su, J., Zhang, R., Peng, L., Li, Q.** (2012). Identification and expression profiles of grass carp *Ctenopharyngodon idella* tlr7 in responses to double-stranded RNA and virus infection. *J. Fish Biol.* 80, 2605–2622.
- Yang, D., Liu, Q., Ni, C., Li, S., Wu, H., Wang, Q., Xiao, J., Zhang, Y.** (2013). Gene expression profiling in live attenuated *edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: Insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish. *Dev. Comp. Immunol.* 40, 132–141.
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R.M., Günther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schuberth, H.J., Seyfert, H.M.** (2008). Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45, 1385–1397.
- Yao, C.L., Kong, P., Wang, Z.Y., Ji, P.F., Liu, X.D., Cai, M.Y., Han, X.Z.** (2009). Molecular cloning and expression of MyD88 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 249–255.

- Ye, J.M., Kaattari, I.M., Ma, C.Y., Kaattari, S.** (2013). The teleost humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1719–1728.
- Yu, Y., Zhong, Q.W., Li, C.M., Jiang, L.M., Wang, Y.N., Sun, Y.Y., Wang, X.B., Wang, Z.G., Zhang, Q.Q.** (2012). Identification and characterization of IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 609–615.
- Zante, M.D., Borchel, A., Brunner, R.M., Goldammer, T., Rebl, A.** (2015). Cloning and characterization of the proximal promoter region of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6 gene. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 249–256.
- Zapata, A.G., Chiba, A., Alberto, V.** (1996). The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment. Kapitel IIC, S.5
- Zhang, C.Z., Yin, Z.X., He, W., Chen, W.J., Luo, Y.W., Lu, Q.X., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.** (2009). Cloning of IRAK1 and its upregulation in symptomatic mandarin fish infected with ISKNV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 298–302.
- Zhang, C.Z., Yin, Z.X., He, W., Chen, W.J., Luo, Y.W., Lu, Q.X., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G.** (2009). Cloning of IRAK1 and its upregulation in symptomatic mandarin fish infected with ISKNV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 298–302.
- Zhang, G.L., Ghosh, S.** (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277, 7059–7065.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G., Li, X.** (2014). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 380–388.
- Zhao, F., Li, Y.W., Pan, H.J., Shi, C. Bin, Luo, X.C., Li, A.X., Wu, S.Q.** (2013). Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 993–997.
- Zhu, L.Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.X., Shao, J.Z.** (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 39–62.

C Anhang 1 - Veröffentlichungen

C1 Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

- November 2013 **A. Brietzke**, T. Goldammer, H. Rebl, T. Korytář, B. Köllner, A. Rebl, H.-M. Seyfert
 „Characterization of the interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-encoding gene in salmonid fish: The functional copy is rearranged in *Oncorhynchus mykiss* and that factor can impair TLR signaling in mammalian cells.”
Fish and Shellfish Immunology; 36:206-214
- August 2014 A. Rebl, **A. Brietzke**, T. Goldammer & H.-M. Seyfert
 „GRP94 is encoded by two differentially expressed genes during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).”
Fish Physiology and Biochemistry; 40:1917-1926
- Februar 2015 **A. Brietzke**, T. Korytář, J. Jaros, B. Köllner, T. Goldammer, H.-M. Seyfert, A. Rebl
 „*Aeromonas salmonicida* infection only moderately regulates expression of factors contributing to Toll-like receptor signaling, but massively activates the cellular and humoral branches of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).”
 Angenommen vom *Journal of Immunology Research*
- Mai 2015 **A. Brietzke**, M. Arnemo, T. Gjøen, H. Rebl, T. Korytář, T. Goldammer, H.-M. Seyfert, A. Rebl
 „Structurally diverse genes encode TLR2 in rainbow trout: The conserved receptor cannot be stimulated by classical ligands to activate NF-κB in vitro”
 Eingereicht bei *Developmental and Comparative Immunology*

C2 Konferenzen & Workshops

April 2011	Fisch-Immunologie <i>Workshop</i> Wageningen Tagungsband und Posterpräsentation: „Comparative characterization of Interleukin 1 receptor-associated Kinase 4 (IRAK4) from selected salmonids“
September 2011	DGFZ-Jahrestagung Weihenstephan Tagungsband und Vortrag: „Vergleichende Charakterisierung der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase 4 (IRAK4) bei ausgewählten Salmoniden“
November 2011	Tag des Doktoranden FBN Dummerstorf Vortrag: „Pathogen- und Zelltyp-spezifische Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) sowie Faktoren des intrazellulären TLR-Signalweges bei Salmoniden“
Mai 2013	Tag des Doktoranden FBN Dummerstorf Tagungsband und Vortrag: „Toll-like receptors in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>): Structure of TLR2 and regulation of factors contributing to TLR signaling during infection“
September 2014	DGFZ-Jahrestagung Dummerstorf Tagungsband und Vortrag: „Regulierung von Faktoren des TLR-Signalweges im Verlauf einer <i>Aeromonas salmonicida</i> Infektion in der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)“

D Anhang 2 - Methoden

Anhang 2.1 Tabelle: Oligonukleotide für die Isolierung der Nukleotidsequenzen

Name	Sequenz (3'-5')	Anwendung
TLR2 cDNA		
TLR2_f1	TCARGATGATGTGGGCGTGGCT	Fragmentisolierung:
TLR2_r1	GGTGKTGGAGCTCAKGAGYTTGC	Voramplifikation
TLR2_f2	GACGCCTTYGKTCTACAGC	Fragmentisolierung: nested
TLR2_r2	CAGYTTGCAGAARCGCTKGGG	PCR
TLR2_f3	CGCCTTTGTGTCGTACAGCGA	3' RACE
TLR2_f4	TGGTTCCAGAGCTGGAGGATTC	3'n RACE
TLR2_f5	GGAGGTCCCKGCTCTGGAGG	5'-Bereich
TLR2_r3	GCGTCTTGCTCGCTGTACGA	5'-Bereich
TLR2_r4	GTCATGGATGATAGAGGAGACGA	5' RACE
TLR2_r5	CCTGGAATGGTCCTCGGAGA	5'n RACE
TLR2_f6	CATCTCCTGGTTACATCAGGTC	TLR2 OLR
TLR2_r6	GAATTCCAGACTACCCGGAAC	TLR2 OLR
TLR2_r7	GGCATTGGAACGGTGAGAGC	5'-Genome Walk
TLR2 genom.		
TLR2_r8	GAGGATTCCCAGATTTCTGCT	Validierung 1. Intron (5)
TLR2_r9	CCGGGTACATTCCCACAATTC	Validierung 1. Intron (5)
TLR2_f7	GCCTGAAGGTCCTCCTGATCC	Validierung 1. Intron (5)
TLR2_f8	GTTTGGGCCTTTGGACCTCC	Validierung 1. Intron (5)
TLR2_f9	GCACGCTTATTTGTACGTTTATCT	Verbindung Intron 5 mit alternativem 3'-Ende
TLR2_r10	TCGACTGCGTTCCATTGCAT	Verbindung Intron 5 mit alternativem 3'-Ende
TLR2_f10	GTCTACCCCCGACCCTGGAG	Introns 5' vom Intron 5
TLR2_r11	CAAAAATCAAAGGCAGGACCCTA	Introns 5' vom Intron 5
TLR2_f11	CCTTCCTGCCTGTGGGGTTT	Introns 5' vom Intron 4
TLR2_r12	CTCTCTACCTAGGGAACAACCA	Introns 5' vom Intron 4
IRAK4 cDNA		
IRAK4_f1	TTGGATGGTAGCCCTCCTCTTT	Erstes Fragment
IRAK4_r1	CTTTCATCTCCATCAGGAAGTTC	Erstes Fragment
IRAK4_f2	CAACCACCATGTCCACAGAG	3' RACE
IRAK4_f3	ATGAAAACCGTGATCCCAAG	3'n RACE
IRAK4_f4	AGGGATGGTAGGCAACAGTG * ¹	5'-Bereich
IRAK4_r2	CTCTGTGGACATGGTGGTTG	5'-Bereich
IRAK4_r3	TTGCCTACCATCCCTTTGTC * ²	5' RACE
IRAK4_r4	AGTACCTCGGCTCCCTGT	5'n RACE
IRAK4_r5	TGGCTCATCAAAATGTCCAC * ³	5' RACE
IRAK4_r6	CCCCTGTAAACTACTGCTTCAA * ³	5'n RACE
IRAK4_f5	CCGAGGATGAGCAACACAATAACA * ⁴	IRAK4 OLR
IRAK4_r7	TGAGGGAAAGTCGTTCTTCCTGTT * ⁴	IRAK4 OLR

*¹ *Primer* von Lachs-IRAK4-cDNA (NM_001141766) abgeleitet; *Primer* beinhaltet zwei Substitutionen G = A, T = C)

*² *Primer* beinhaltet eine Substitution C = T

*³ *Primer* spezifisch für die IRAK4-cDNA des Ostseeschnäpels (FN598576)

*⁴ *Primer* spezifisch für IRAK4-cDNA des Atlantischen Lachs (NM_001141766)

Anhang 2.2 Tabelle: Oligonukleotide für die Expressionsklonierung

Name	Sequenz (3'-5')	Anwendung
TLR2_K		
TLR2Ex_Hi_f1	AGCT AAGCTT GGGTCTCTGGCCATG CTGGTCCTCCTCTTCTTCTCTC	Für TLR2 Expression mit Enzymschnittstellen
TLR2Ex_Kp_r1	AGCT GGTACCT CACAGCTCATCTCC GCCCCCT	Für TLR2 Expression mit Enzymschnittstellen
TLR2Ex_f2	CAACCTGGACACAGTCTACTTC	Für TLR2 Expression ohne TLR2-Stopcodon
TLR2Ex_Kp_ Stop _r2	GCTAG GTACCC AGCTCATCTCCGCC CCTCA	Für TLR2 Expression ohne TLR2-Stopcodon mit Enzymschnittstelle
GFP_Kp_f	AGCT GGTACC AGTAAAGGAGAAGA ACTTTTCACTG	GFP für TLR2 Expression
GFP_Kp_r	TCGAG GTACCC TACTTGTATAGTTC ATCCATGCCAT	GFP für TLR2 Expression
TLR2MP_Xb_f	AGCT TTCTAG ACTTGTTGAACCGTCTC GTTAGG	Amplifikation TLR2b-LC- Fragment zur Einklonierung
TLR2MP_Ba_r	AGCT GGATCC CACAGGGCAGAATGA AACCGTAC	Amplifikation TLR2b-LC- Fragment zur Einklonierung
IRAK4_Ex		
IRAK4Ex_Sp_f	CAACT ACTAGT ATGAGCAACACAAT AACATCGGT	Für IRAK4 Expression mit Enzymschnittstellen
IRAK4Ex_Ec_r	GTTGAGA ATTCT GCTTCACTCTGGG GTCCCA	Für IRAK4 Expression mit Enzymschnittstellen
IRAK4Ex_CMV_f	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Für IRAK4 Expression Einfügen Stopcodon
IRAK4Ex_Ec_Stop_r	AGCT GAATTC CTA TGCTTCACTCTGG GGTCCCAG	Für IRAK4 Expression Einfügen Stopcodon

Anhang 2.3 Tabelle: Oligonukleotide für die quantitativen Analysen (PRRs)

Primer-name	Sequenz forward (3'-5')	Sequenz revers (3'-5')	Primer-effizienz	Fragment-länge [bp]	T _m [°C]	Datenbank-nummer
TLR1_RT	AAAGACAGAGATGAGGGCTGTG	TGAAATCTCACGGCCAAAG	2.04	161	85.5	NM_001166101
TLR1_LC		CGGTGCATGGAGGTAGGTTTC				
TLR2_RT	GGAGAGGAGACCTGGCTGGA	GTCATGGATGATAGAGGAGACGA	1.88	141	85.6	HE979560
TLR2_LC	GCCAGGCCACTGGATCAGA	CCTGGAATGTCCTCGGAGA	1.89	197	86.4	HE979560
TLR2a_LC	CTTGTTGAACCGTCTCGTTAGG	GAACGTCGTCCTTGGAGATGG	1.95	195	84.5	LK933547
TLR2b_LC		ACAGGGCAGAAATGAAACCGTAC				
TLR3_RT	AGTCCTCCACCTGTGCAATCTA	CCAGGCCTTTGAAGGTGGTG	2.01	154	83.1	NM_001124578
TLR3_LC		GATCGCTGTCCAGAAAAGCTC				
TLR5_RT	CAACTTCTTCGTTTGGCTGATAAT	TCCCCGTGCCCATATCATCT	1.94	160	78.7	NM_001124744
TLR5_LC		ACCAGAGAAACTCAATGTGCATTA				
TLR7_RT	TGCACAGAGAGTGTGACTATCAA	AGCTGTAAAAACGCTCCCTCCTC	2.00	179	82.9	GQ422119
TLR7_LC		ATGTCAGAGAGGTTCGTTTTCAG				
TLR8a1_RT	CTGTGTCACTTCCGTGTCATAAA	GAAGGCACCTTCGGCAATGT	2.05	187	82.5	GQ422121
TLR8a1_LC		TTTTCTGATAGTCCAGCACAGT				
TLR8a2_RT	TCTCGAATATGAGCAACCTTTGTC	GAGCATTGGAGCATCGTGGGA	1.97	183	80.5	GQ422120
TLR8a2_LC		AGTCCTTTTGGAAACACGAGTTAAA				
TLR9_RT	TGGTATTGCTTCCAGGTGCTGT	TGCTCGTCAGCACAAACACG	2.01	155	88.0	NM_001129991
TLR9_LC		CTCCAGGTGGACCAGCAGCT				
TLR19_RT	GAGAGGAGGAGGTGAGGTATG	TCTCCAGGCCACACCCAGTCA	2.07	154	86.4	HF952170
TLR19_LC		ATGCCCTTCCCTACCTCAAAGT				
TLR20_RT	ACCCTCCGTCTGCTGGTGA	GCCAGGGTGTGTTTCAGGAG	1.87	174	87.3	DQ872849
TLR20_LC		CCACAGACGGTCCCAAGAAG				
TLR21_RT	CTGTTGAGGCAGGTGCAACTAA	TCTCCAGGTCCAGGTAGCAA	2.06	156	83.2	CX261318
TLR21_LC		CTCAAAGGAGGTTTTTGGGAATC				
TLR22a1_RT	TGGACAATGACGCTCTTTTACC	CGGGATAAATCCAAACAGCCTCA	2.02	151	83.6	NM_001124412
TLR22a1_LC		GAGCTGATGTTGCAATGAGG				
TLR22a2_RT	TAGAAAGTCGTACCAAAAAGACATT	TCCCAATGGAATTCGGGATAA	2.03	161	79.8	NM_001124419
TLR22a2_LC		GAGAGACCCCATCATCCACTGAA				
NOD1_RT	CCGGTCAGCTGCTACGATGC	Oligo(dT)	2.02	160	85.0	CA372055
NOD1_LC		AGTGCAGCAGGAGGGGCAAAA				

Anhang 2.4 Tabelle: Oligonukleotide für die quantitativen Analysen (intrazelluläre Faktoren, Zytokine sowie T- und B-Zellmarker)

Primer-name	Sequenz forward (3'-5')	Sequenz revers (3'-5')	Primer-effizienz	Fragment-länge [bp]	Tm [°C]	Datenbank-nummer
MYD88_RT		CCCCCTCTGGGTCATCCTC				
MYD88_LC	GATCAAGAATTACGAGGATTGCC	CCTCAATGAGAACTCGGAGATC	1.92	155	83.7	NM_001124421
IRAK4a_RT		TGAGGGATAGTCGTTCTTCCTGTTG				
IRAK4a_LC	GAGATTGATGAGGAGGATGG	TCAAAGCTCTGTCAGGACCTCTT	2.02	161	84.7	FN598575
IRAK4b_RT		CAAGTCCGACACCTCGCATG				
IRAK4b_LC	CGTCAGCGACAGTGATGACAG	GTCTGTGCAATTGTGTAGTTCCA	2.00	164	82,6	HG530316
IRAK1_RT		CTGCGACGGAGCAGCAAGT				
IRAK1_LC	ATGGACAGTATCTCCGATGTGG	TGCAGCTTGTCAGTACGTTCA	1.97	173	85.2	CA378286
TRAF6_RT		AAGCCCTTGGGGTTCCTCTG				
TRAF6_LC	CTCCAAAACGCCCTCGGCACA	CCACATGCTGTGGCCCTCA	1.84	154	88.4	BX081400
TOLLIP_RT		CAGTGGGCACTCCTGCAATG				
TOLLIP_LC	CTCAGTGGCAGACAAGGCGA	TCAGATATGGACATCTGCTTA	2.06	537	86.6	NM_001124420
IL1B_RT		TTCCACAGCACTCTCCAGCAA				
IL1B_LC	AAGTCTTTAAGCAACTGACTAAGC	TGCACCTTTCAGAGGTGTTCTTTAT	2.06	152	79.2	NM_001124347
TNF_RT		CTGACCTTACCCCGCTAAGAAAG				
TNF_LC	GATACCCACCATAACATTGAAGCA	ATTTGGTTCCCTGTAGCTCGA	2.01	162	84.9	NM_001124357
IL8_RT		TTCCAACTGGATAGAACATGATAGAA				
IL8_LC	CTGAGGGGATGAGTCTGAGAG	ATCTCCTGACCGCTCTTGCTC	2.05	162	85.3	AJ279069
IL10_RT		GGTTTGAACAACAATGCGCAGA				
IL10_LC	CTCAGATGCGGTTTTCAAACACT	CACAGTAAAGCACTGGAACACAC	2.03	155	81.5	AB118099
TGFB_RT		CCTTGTGTGTCTCCCCACATAAT				
TGFB_LC	ATCAGGGATGAACAAGCTGAGG	TTCGCACACAGCAACTCTCCG	1.72	182	83.5	X99303
IgM_RT		GAGCTGACTGTAGACAGAGTAG				
IgM_LC	TACAAGAGGGAGACCGGAGGA	CACCGGCTCATCGTCAACAAG	1.92	159	84,5	S63348
TRB_RT		ATGAAGATGCTGTAGGCCAGCT				
TRB_LC	GTCTTCTGGCAAGTCAACAATGT	GTAAAAAGCTGACAAATGCAGGTGA	1.94	165	83.7	EU072699

Anhang 2.5 Tabelle: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien/Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Agarose	BIODEAL, Markkleeberg, D
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<i>Antibiotic-Antimycotic</i> (100X), <i>liquid</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Antikörper, anti-GFP, rabbit IgG fraction	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Antikörper, Anti-Rabbit IgG Al. Phos.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, D
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
ColorPlus <i>Prestained</i> Protein Marker	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Coomassie-Brillant-Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dimethylformamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Madison, WI, USA
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Pan Biotech, Aidenbach, D
FA (Formaldehyd)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Gentamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	SERVA, Heidelberg, D
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IPTG	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Isoamylalkohol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<i>Lipofectamine</i> ® 2000	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
NEAA	Biochrom, Berlin, D
PBS (Salz)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Phenol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Phenol:Chloroform 5:1	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase-ExitusPlus™	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Roti®-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salmon Genomic DNA	Zyagen Laboratories, San Diego, Ca, USA
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton X	Boehringer Mannheim (heute Roche)
QIAzol Lysis Reagent	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
X-GAL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Anhang 2.6 Tabelle: Verzeichnis der verwendeten Reagenziensätze

Kits	Hersteller
BCIP/NBT KIT	Life Technologies , Carlsbad, CA,
<i>Endo Free Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<i>GenomeWalker™ Universal Kit</i>	Clontech, Mountain View, Ca, USA
<i>GenRacer Core Kit</i>	Life Technologies , Carlsbad, CA,
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche, Basel, Schweiz
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Madison, WI, USA
RNeasy Plus Universal Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Medien	Zusammensetzung
<u>HEK-Zellkulturmedium</u>	
SIGMA EMEM	450 ml
FKS (10 %)	50 ml
L-Glutamin (2 mM)	5 ml
NEAA (1 %)	5 ml
(für Antibiotikamedium)	
Gentamycin	10 µl
APS	100 µl
<u>SOC-Medium</u>	
Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
H ₂ O _{dest}	ad 100 ml (autoklavieren)
NaCl	200 µl einer 5 M
KCl	125 µl einer 2 M
MgCl ₂	500 µl einer 2 M
MgSO ₄	500 µl einer 2 M
Glukose	1000 µl einer 2 M
<u>TY-Medium</u>	
Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
Ampicillin (100 mg / ml)	1 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
<u>TY-Kulturagar</u>	
TY-Medium	1000 ml
Agar	20 g
X-GAL	40 mg (gelöst in 2 ml
IPTG	80 µl einer 0,5 M
Puffer	
<u>Geltrockenpuffer</u>	
Glycerin	50 ml
Ethanol	100 ml
H ₂ O _{bide}	ad 500 ml

Medien	Zusammensetzung
<u>Laemmli-Probenpuffer (2x)</u>	
TRIS (pH 6,8)	1,67 ml
Glycerin	4 ml
SDS (20 %)	4 ml
Bromphenolblau-Lösung (1 %)	0,4 ml
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 20 ml
<u>Laufpuffer (SDS-PAGE) (5 x)</u>	
TRIS	30,25 g
Glycin	144 g
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 2000 ml
<u>PBS</u>	
H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
PBS (Salz)	4,78 g
<u>Proteinase K-Reaktionspuffer</u>	
EDTA	15 ml einer 0,5 M
Tris HCl pH8 (1 M)	2,5 ml einer 1 M
NaCl (5M)	1 ml einer 5 M
H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 500 ml
vor dem Gebrauch auf 10 ml Puffer	
DTT (1 M)	60 µl einer 1 M
Proteinase K (20mg / ml)	250 µl mit 0,5 mg / ml
SDS (20 %)	500 µl einer 1 %igen
<u>RNA-Laufpuffer (10 x)</u>	
MOPS 3-(N-morpholino)propansulfonsäure (0,4M)	41,85 g
Natriumacetat (0,1 M)	6,8 g
EDTA (0,0014 M)	1,86 g
H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 500 ml
NaOH	Auf pH 7 einstellen
DEPC	0,1 %
<u>SDS-Färbelösung</u>	
Coomassie-Brillant-Blau	4 g
Methanol (100 %)	350 ml
Essigsäure (70 %)	262 ml
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 3500 ml
<u>SDS-Gelentfärber (filtriert)</u>	
Coomassie-Brillant-Blau	
Methanol (100 %)	2000 ml
Essigsäure (70 %)	400 ml
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 4000 ml
<u>TBE-Puffer 10 x (1 l)</u>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	40 ml einer 0,5 M
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 1 l

Medien	Zusammensetzung
<u>TE-Puffer (100 ml)</u>	
Tris (basisch)	1,211 g
EDTA	0,3722 g
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 100 ml
<u>Sonstige</u>	
<u>Waschlösung (WB)</u>	
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 1 l
Roti®-Block (1,6 %)	16 ml
Triton X (0,2 %)	2 ml
SDS (0,1 %)	5ml einer 20 %
<u>Blockierlösung (WB)</u>	
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 100 ml
PBS (1 x)	5 ml einer 10 x
Roti®-Block (5 %)	5 ml
MgCl ₂ (0,05 M)	12,5 ml einer 2 M
<u>DETECIII</u>	
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 0,5 l
TRIS (0,1 M)	50 ml einer 1 M (pH 9,5)
NaCl (0,1 M)	10 ml einer 5 M
<u>Lösung I</u>	
Glukose	25 ml einer 1 M
Tris	12,5 ml einer 1 M
EDTA	10 ml einer 0,5 M
<u>Lösung II</u>	
NaOH	20 ml einer 10 M
SDS	25 ml einer 20 %
<u>Lösung III</u>	
Kaliumacetat	300 ml einer 5 M
Essigsäure	57,5 ml einer 96 %
H ₂ O _{dest}	142,5 ml
<u>Stopp-Lösung (100 ml)</u>	
Glycerin	56,5 ml einer 87 %
Bromphenolblau	0,1 g
EDTA	24 ml einer 0,5 M
Tris	1 ml einer 1 M
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 100 ml
<u>Transferlösung (WB)</u>	
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 0,5 l
TRIS HCl (10 mM)	5 ml einer 1 M (pH 8,2)
EDTA (2 mM)	2 ml einer 0,5 M
NaCl (50 mM)	5 ml einer 5 M

Anhang 2.7 Tabelle: Verzeichnis der verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>Cellstar</i> [®] Zellkulturschalen	Greiner Bio One, Kremsmünster, A
<i>Cellstar</i> [®] 6Well Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster, A
<i>ChemiDoc</i> [™] Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Digitalwaage PRJ	Kern, Balingen, D
Elektrophorese-Kammern (DNA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Elektrophorese-Kammern (RNA)	Pharmacia Biotech (heute: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Gel Blotting Papier Whatman 3 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Geltrocknungsrahmen (Blatt Cellophan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Heizblock Dri-Block [®] DB-3D	TECHNE, Staffordshire, UK
<i>High Performance</i> UV-Transilluminator	UVP, Cambridge, Großbritannien
Hitzestabile Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Hoechst 33342 duy	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Laser-Scanning_Mikroskop LSM780	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, D
LightCycler 96 System	Roche, Basel, CH
LightCycler [®] 480 Multiwell <i>Plate</i> 96, <i>clear</i>	Roche, Basel, CH
LightCycler [®] 480 Sealing Foil	Roche, Basel, CH
Lumat ³ LB9508 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Lumat ³ LB9508 Röhrchen	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Mini-PROTEAN [®] Protein-Elektrophorese-Zelle	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NanoDrop [®] ND-1000 <i>Spectrophotometer</i>	peQLab, Erlangen, D
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, D
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen (10 µl; 50 µl; 100 µl; 1 ml; 5 ml)	SARSTEDT, Nürnberg, D
Polypropylen Röhrchen, 10ml, 50ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, A
Power Pack P25 (Spannungsquelle)	Biometra, Göttingen, D
Precellys [®] 24 Homogenisator	peQLab, Erlangen, D
Serologische Rotilabo [®] -Pipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Standard Zellkultur Schalen	Greiner Bio One, Kremsmünster, A
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, D
Wasserbad Schüttelinkubator W6	Funke medingen, Freital, D
2 ml Mikro-Schraubröhren	SARSTEDT, Nürnberg, D
2,8 mm beads	peQLab, Erlangen, D
250 ml Erlenmeyerkolben	SIMAX, Boca Raton, FL, USA
10 % Mini-PROTEAN [®] TGX [™] Gel	Biometra, Göttingen, D

Anhang 2.8 TLR2: Gesamtklon für die quantitativen Analysen der TLR2-Varianten

Der in Punkt 3.1.1.1 beschriebene TLR2-Gesamtklon (Fragmentamplifikation mit [TLR2_f6 TLR2_r6]) enthielt Zielsequenzen für die Restriktionsenzyme XbaI (Pos. 975 bp bis 980 bp) und BamHI (Pos. 1289 bp bis 1294 bp). Aus der Sequenz für das in Punkt 3.1.1.1. beschriebene alternative 3'-Ende leiteten wir *Primer* mit den entsprechenden Schnittstellen ab [TLR2MP_Xb_f: 5' AGCTTCTAGACT TGTGAACCGTCTCGTTAGG 3' (Pos. 177 bp bis 200 bp); TLR2MP_Ba_r: 5'

xxvii

TLR2MP	ATTATCCATGCAATGGAACGCAGTCGACGCACCTCTTCGTCCTGTGAGAACTTCGTCCATTCTGAGTGGTGCCGGTA	2240
TLR2MP	CGAGTTGGACTTTTCCCACTTCGCTCTGTTTGACGGGGACTCAGAGGCGGCCCTCGTGGTCTTCTGGAACCCATCTCCA	2320
	<GGTAGAGGT	
TLR2MP	AGGACGACGTTCCCAAACGCTTCTGCAAGCTCCGCAAGTTGATGAGCTCCCGTACCTACCTGGAGTGCCGCGCAGGAGGAC	2400
	TCCTGCTGCAAG :TLR2a_LCr	
TLR2MP	GAGAGGAGGGCAGAATTCTGGAACAACCTCCGCTCTGGCCGTGAGGGGCGGAGATGAGCTGTGATCCAACCGG GTTCCGGG	2480
	<CAAGGCC	
TLR2MP	TAGTCTGGAATTC ATCACTAGTGAATTTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTGGATGCA	2560
	ATCAGACCTTAAG :TLR2_r6	
TLR2MP	TTGTGA-----	2566

Abbildung Anhang 2.8: Sequenz des Messplasmids für TLR2 (LRR), TLR2a und TLR2b TVX1:

Die Zielsequenzen für das gemeinsame Messplasmid wurden in pGEM®-T Easy kloniert (graue Basensymbole). Die genutzten Enzymschnittstellen sind grau unterlegt. Die *Primer* die zum Klonieren verwendet wurden sind fett markiert und unterhalb der Matrixsequenz eingetragen. Die *Primer* für die quantitativen Analysen sind wie auch die Sequenz des quantifizierten Fragments zusätzlich unterstrichen. Die reversen *Primer* sind revers und komplementär zur Zielsequenz dargestellt.

Anhang 2.9 Die TLR2-Expressionsklonen

Für TLR2 Expressionsversuche wurde zunächst der offene Leserahmen mit den *Primern* [TLR2Ex_Hi_f1: 5' AGCTAAGCTTGGGTCTCTGGCCATGCTGGTC CTCCTCTTCTTCTCTC 3' (Pos. 124 bp bis 160 bp); TLR2Ex_Kp_r1: 5' AGCTGGTACCTCACAGCTCATCTCCGCCCT 3' (Pos. 2521 bp bis 2541 bp) beide auf HE979560] amplifiziert und mit den entsprechenden Enzymschnittstellen versehen. Das Fragment wurde in den *pFLAG-CMV Mammalian Expression Vector* einkloniert (Abbildung Anhang 2.9).

Für die Expression des TLR2-GFP-Konstruktes wurde im Expressionsvektor zuerst das Stopcodon des TLR2 entfernt. Dafür nutzten wir das *Primer*paar [TLR2Ex_f2: 5' CAACCTGGACACAGTCTACTTC 3' (Pos. 1053 bp bis 1074 bp); TLR2Ex_Kp_Stop_r2: 5' GCTAGGTACCCAGCTCATCTCCGCCCTCA 3' (Pos. 2519 bp bis 2538 bp) beide HE979560]. Das Oligo TLR2Ex_f2 lag dabei stromaufwärts einer BglIII-Schnittstelle.

TLR2-GFP	ATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAATTAATTCACCATCTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCT	-031
TLR2-GFP	GCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGAC AAGCTTGGGTCTCTGGCCATGCTGGTCTCTCTCTCTC AGGGT	0048
TLR2Ex_Hi_f1: AGCTAAGCTTGGGTCTCTGGCCATGCTGGTCTCTCTCTCTCTCTC>		
TLR2-GFP	CAAAGTTCAACCCAGAGGTCGAGAAGAGGTCAACGTGTGATCAATGTGACGAACGTCTCTTCTGCAACTGCTCTCC	0126
TLR2-GFP	CGGAATTACCGACACGTTCCACGGTAACCGTCACTGAGGTGCGTAACCTCGACCTCTCTTCAACGACATCACCTCG	0204
TLR2-GFP	GTTGCTGAGGACGATCTGAGAGAGTACACGTGGTTACGAACCTTGATCTCCATAGCAACAGGATCGAGAGTATCCAC	0282
TLR2-GFP	GAATGGGCCTTCCACCTTCTGCAGGGCCTGGAGTCTCTGGACTTGCTTATAACCAAGCTGGCTGCTTTGAATCCGGCC	0360
TLR2-GFP	TGGTTTCCAAGCTCCTCTCCCTACAACACCTCAACCTGCTGGGCAGCTGTTACAGGACCTCGGCCCTGGAGGGACG	0438
TLR2-GFP	CTGTCTCTCTTCAGGTCTCTGACCAAGCTGAGGTTTCTGAGGTTTGGGAACCTGCTCTGGAGGAGGTGAGGAGGA	0516
TLR2-GFP	GACCTGGCTGGAGTCAGACAGTTGGACCAAGCTGGAGGTCTACGGGAATAACCTGAAGAGGTATGACCTTGAAGCCTG	0594
TLR2-GFP	GACCTGGCTGGAGTCAGACAGTTGGACCAAGCTGGAGGTCTACGGGAATAACCTGAAGAGGTATGACCTTGAAGCCTG	0672
TLR2-GFP	GGTGATCTTTGGCCTTAGGGGTCGTGACCTGCGTCTCCGAGGACCATTCAGGACAAACGACACTCGTCTCCTCT	0750
TLR2-GFP	ATCATCCATGACGCTCTCTACTCAGAAACCTTCTGGTAGTCGTGACGTCTGCTGTCGAGAGACCTCCGTCGCA	0828
TLR2-GFP	CCGTTTCAGAGAGACCAACCGGAGACGGTGCGGTCCATAATGTTCAGAACGCAACCTTGACGGATGAGGCCATAGTT	0906
TLR2-GFP	CACCTCATGGAGTTATGGACGGGGCTTCTAGAGTTCTTGGGAGTAGAGGACGCAACGTTCCATGGTACAGGCTCA	0984
TLR2-GFP	TGGACGCGCGCTAGACGACTCACCTTGAC CAACCTGGACACAGTCTACTT CAGAACATAGAGGTCATGAATGTCTAT	1062
TLR2Ex_f2: CAACCTGGACACAGTCTACTTC>		

TLR2-GFP	AAGTTCACCTCCTTCCTGCCTGTGGGGTTTCTACTGAAAAACCTCAGACAGATCTCTATCATTAAGTGTAT	1140
TLR2-GFP	GTGATGCGGTGTGACCTCTCTCTGTTGACCCAAATGGGTACCTGGACCTGAGTGGTAACCTACTGACCGACCTG	1218
TLR2-GFP	ACCTGACGGAATCTCTGTGTACGGGATGGGATCCTGAGGAATCTCAGAGTTATCAACGTCAGCGCAATGCCCTG	1296
TLR2-GFP	AAGTCCATTTCCCTCATCAGCAAACCTCGTCACCCGCTCGGACAACTAGTCCACCTGGACATCAGTCAGAACGCCTAC	1374
TLR2-GFP	ACCTCCATGGCCTCCACCTGCTCCTGGCCACAGATACTGACTCACTCAACCTCTCGAGGGCTAAGCTACGGAGGTC	1452
TLR2-GFP	ACCCCTGTCTACCCCCGACCTGGAGATCCTGGATCTGGGACATAACGACCTGACAGCCTTCCATAGTGTAGCTCTC	1530
TLR2-GFP	CCGGCCCTGAGGGAGCTGCACCTCTCTGGGAACAAGCTGATGAGTCTTCCCTGGATGGTGTTCCTAGCCTGAAG	1608
TLR2-GFP	GTCTCTGATCCAGAGCAACACTCTCAACATGTTTGGGCCTTTGGACCTCCAACTCTACAGGAGGCTCCGAGCACTG	1686
TLR2-GFP	CAGGCCGTGACAGACAGGTTTGTGTCTCTGCGAGTTTGTCAACTTCATGGTCTGGAGGTGGGGTGGAGCAGTAGAG	1764
TLR2-GFP	GGCAGTGTGAGCTAACAGACAGATGGGATAACTACCTTTGTGACTCACCGCTGCCCTGACAGGCCAGAGGGTAGAC	1842
TLR2-GFP	CGCGTCCAGCTCTCACCGTTTCAATGCCACCGCATCTCTCCTCGTCTCCTCACTCTGCGGCTGCATGCTCGCTCCGGA	1920
TLR2-GFP	ATCCTGTTTGTAAATCTGCTCTGGAAGATTCACGCCGTGTGGTACGTGAGGATGATGTGGCGTGGCTTAAAGCCAAA	1998
TLR2-GFP	CGGAATCCGGGAACAGAGCGCCGGATGCCGACGGGAATGCCCTACCTCCTCTGCTATGACCGCTTCTGTCTGTAC	2076
TLR2-GFP	AGCGAGCAAGACGCAGAGTGGGTGGAAGAATTCCTGGTTCAGAGCTGGAGGATTTCCAGCCTCCGCTCACCTCTGC	2154
TLR2-GFP	CTCCACAGAGAGACTTCTGCCAGGCCACTGGATCATCGACAACATTATCCATGCAATGGAACGCAGTCGACGCACC	2232
TLR2-GFP	CTCTTCGCTCTGTCAGAACACTTCGTCATTCTGAGTGGTGCCGTCAGGATGGACTTTTCCCACTCCGCTCTGTTT	2310
TLR2-GFP	GACGGGGACTCAGAGCGGCCGCTCTGGTCTCTGGAACCCATCTCCAAGGACGACGTTCCCAAACGCTTCTGCAAG	2388
TLR2-GFP	CTCCGCAAGTTGATGAGCTCCCGTACCTACCTGAGTGGCGCAGGAGGACGAGAGGAGGGCAGAATTCTGGAACAAC	2466
TLR2-GFP	CTCCGCTGCGCCGTGAGGGGCGGAGATGAGCTGGGTACCAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAGTTGTCCCAATT	2544
<ACTCCCCGCTCTACTCGACCCATGGATCG: TLR2Ex_Kp_r1:		
<TCCCGCCTCTACTCGACACTCCATGGTCTGA: TLR2Ex_Kp_Stop_r2:		
GFP_Kp_f: AGCTGGTACCAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTG>		
TLR2-GFP	CTTGTGTAATTAGATGGTGTATTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA	2622
TLR2-GFP	AAACTTACCCTTAAATTTATTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTCACTTAT	2700
TLR2-GFP	GGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTAT	2778
TLR2-GFP	GTACAGGAAAGAAGTATATTTTCAAGATGACGGGAAGTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACC	2856
TLR2-GFP	CTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACAATTTGGAATACAAC	2934
TLR2-GFP	TATAACTCACACAATGTATACATCATGGCTGACAAGCAGAAGAACGGAATCAAGGCCAACTTCAAGACCCGCCACAAC	3012
TLR2-GFP	ATCAGAGGACGGCGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCA	3090
TLR2-GFP	GACAACCACTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTCTTGAG	3168
TLR2-GFP	TTTGTAAACAGTGTGAGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAGTAGGGTACCAGTCGACTCTAGAGGATCCCG	3246
<TACCGTACCTACTTGATATGTTTCATCCATGGAGCT: GFP_Kp_r		
TLR2-GFP	GGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTCCCAACAGCCTTGTC	3324

Abbildung Anhang 2.9: Sequenz des TLR2-GFP-Expressionplasmids:

Die Sequenz des Expressionsplasmids ist unterstrichen und die GFP-Sequenz ist kursiv geschrieben. Die genutzten Enzymschnittstellen sind grau unterlegt (HindIII schneidet [5' AAGCTT 3' Pos. 0 bis 6]; BglII schneidet [5' AGATCT 3' Pos. 1112 bis 1118]; KpnI schneidet [5' GGTACC 3' Pos. 2489 bis 2495]). Die *Primer* die zum Klonieren verwendet wurden sind fett markiert und unterhalb der Matrixsequenz eingetragen. Die reversen *Primer* sind komplementär zur Zielsequenz dargestellt. Start- [5' ATG 3'] und Stopcodons [5' TGA 3'; 5' TAG 3'] sind eingerahmt.

Dies wurde mit der eingeführten KpnI-Schnittstelle zum umklonieren verwendet. Mit den *Primern* [GFP_Kp_f: 5' AGCTGGTACCAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTG 3'; GFP_Kp_r: 5' TCGAGGTACCCTACTTGTATAGTTCA TCCATGCCAT 3'] wurde ein GFP-Nukleotidfragment mit den entsprechenden Enzymschnittstellen aus dem Expressionsvektor pAM505 (Clontech) isoliert und in das TLR2-Expressionsplasmid ligiert.

Anhang 2.10 Die IRAK4-Expressionsklone

Für den IRAK4-GFP-Expressionsklon wurde zunächst das volle-Länge IRAK4 amplifiziert. Mit den *Primer* [IRAK4Ex_Sp_f: 5' CAACTACTAGTATGAGCAACACAATAACATCGGT 3' (Pos. 59 bp bis 80 bp); IRAK4Ex_Ec_r: 5' GTTGAGAATTCTGCTTCACTCTGGGGTCCCCA 3' (Pos. 1461 bp bis 1480 bp) beide FN598575] statteten wir das volle-Länge-IRAK4 mit

Enzymschnittstellen (SpeI und EcoRI) aus, so dass dieses in den von Yang, W mit GFP modifizierten Expressionsvektor (Abbildung Anhang 2.10) ligiert werden konnte. Für den Expressionsvektor ohne GFP-Faktor nutzten wir ein Oligo, das von der Sequenz des CMV-Promotors 5' von der IRAK4-Sequenz abgeleitet wurde sowie ein Oligo, das ein Stopcodon zwischen IRAK4- und GFP-Sequenz einführt [IRAK4Ex_CMV_f: 5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3' (Pos. -91 bp bis -70 bp auf Sequenz in Abbildung Anhang 2.10); IRAK4Ex_Ec_Stop_r: 5' AGCTGAATTCCTATGCTTCACTCTGGGGTCCCAG 3' (Pos. 1460 bp bis 1480 bp; FN598575)].

IRAK4-GFP	GTGTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGT	-122
	IRAK4Ex_CMV_f: CGCAAATGGGCGGT	
IRAK4-GFP	AGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAGTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGA	-045
	AGGCGTG>	
IRAK4-GFP	AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTTGGCATTCCCACTAGTATCAGCAACACAATAACATCGGTTCGA	0033
	IRAK4Ex Sp_f: CAACTACTAGTATGAGCAACACAATAACATCGGT>	
IRAK4-GFP	AACCTCAACTATGGGGTTCGACGAAAACCTGTCTGACTTATTGGACCCTCAAGACAGCTGGAAAGACGTTATTGTCT	0110
IRAK4-GFP	AAATACATAAACCCACAGGGGAGCCGAGGTACTCTCAGCAACATCTAAGGCGATTGAGCAGTGGTTTACAGGGAA	0187
IRAK4-GFP	GAAGTCTTACCATTGGAGCTACTGAATGACTGGGGGACATCTAAGTGCACCGTGGGAGAGTTAGTGGACATTCTGAT	0264
IRAK4-GFP	AGCCACAGGTTAATGGCTGCAGCCAGTATTATTCTACCATATGCAATCAACAACCCCGTCCAGCAGTCCCCAGCC	0341
IRAK4-GFP	ACCTGATTCTCCAGAGACAAAGAGATGGTAGGCAACAGCGATGCTGCAACAAGACCCCTGGGGAGGACAGAGGAAC	0418
IRAK4-GFP	AGACAAAGGAACAGCCACCACAGACAGCACCTCGGAGCCACAGGAGGACCCGGAACCCAATGGCACTGCCAGTTT	0495
IRAK4-GFP	CTCAGGCTTTCTTTCCAGAGCTGAAGAAGATAACTGGTCAATTTGACGAGAGGCCAGTGAGTGAAGTGGGAGCAG	0572
IRAK4-GFP	ACTTGGTGAGGGCGGCTTTGGAACGGTCTACAAAGGCTCATCAATGGCAAACCTGTGGCAGTGAAGAACTACACT	0649
IRAK4-GFP	CAATGGGAAGACATCTCACTTGAAGAGCTGAGCGTTCAGTTTCAAGAGGTCCAAACTCTTATGGTTTGAACAC	0726
IRAK4-GFP	GAAACCTAGTAGACATGGTTGGCTTTCCCGTGATGGCCATCACCCCTGTTTGGTGTATGCTTACATGTCCAATGG	0803
IRAK4-GFP	TTTATGCTAGATCGTCTGGCTTGGCTTGGATGGTAGCCCTCCTTTTCTGGCACAGGAGATGTTTATCGCTGTGG	0880
IRAK4-GFP	GAACGGCCAGAGGCTTAGATTATCTGCACAGCAACCCATGTCCACAGAGATGTCAAGAGTGGTAATATTGTCTG	0957
IRAK4-GFP	GATGAATTGCTTGTGCCGAAGATCTCCGATTTTGGGCTGACCCGAGCCTCAGCCACGCGATCGTCAGCGACAGTGAT	1034
IRAK4-GFP	GACAGAGAGGATTGTGGGTACAACAGCATACATGGCAAATGAGGCACTCAGGGGCGAGATCACTCCTAAATCTGACA	1111
IRAK4-GFP	TCTACAGTTTGGAGTGGTGTGCTAGAAATATTGTCTGGACTCCCGCCAGTTCGATGAAAACCGTGATCCCAAGTTC	1188
IRAK4-GFP	CTGATGGAGATGAAAGATGAGATTGATGAGGAGGAGATGGCCCTGGAGGACTTTGTGGACAAGAGATGACAGACTG	1265
IRAK4-GFP	GGACCTGCCATTGGTGAGAGGACCTACTTCTTAGCGAGCGACTGTCTCAGTGACAAGAAGAACAAACGGCCACTGA	1342
IRAK4-GFP	TGGAAGAGGTCCTGACAGAGCTTGAAGATGTTGTCAAAAGCATTCTACTGGAACAGCTGGGACCCCGAGTGAAAGCA	1419
	<ACCCCTGGGGTCTCACTTCGT	
	<GACCCTGGGGTCTCACTTCGT	
IRAK4-GFP	GAATTC AGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTATGTTAATGGGCA	1496
	CTTAAGAGTTG : IRAK4Ex_Ec_r	
Stop:	ATCCTTAAGTTCGA : IRAK4Ex_Ec_Stop_r	
IRAK4-GFP	CAAAATTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCCTAAATTTATTGCACTACTG	1573
IRAK4-GFP	GAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGAT	1650
IRAK4-GFP	CATATGAAACGGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAGAAGTATATTTTCAAGA	1727
IRAK4-GFP	TGACGGGAACACAGACAGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTGTTAATAGAATCGAGTTAAAGGTA	1804
IRAK4-GFP	TTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGACACAAATTGGAATACAATACTCACACAATGTATACATCATG	1881
IRAK4-GFP	GCTGACAAGCAGAAGAACGGAATCAAGGCCAATTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCTGCAGCTGGC	1985
IRAK4-GFP	CGACCACTACCAGCAGAACACCCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTAAGTGTCCACACAAT	2035
IRAK4-GFP	CTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAGAGAGACCATGGTCTCTTGTAGTTTGAACAGCTGCTGGGATTACA	2112
IRAK4-GFP	CATGGCATGGATGAATATACAAGGATCCTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC	2189

Abbildung Anhang 2.10: Sequenz des IRAK4-GFP-Expressionplasmids:

Die IRAK4-Sequenz ist unterstrichen, die GFP-Sequenz ist kursiv geschrieben. Die genutzten Enzymschnittstellen sind grau unterlegt (SpeI schneidet [5' ACTAGT 3' Pos. 0 bis 6]; EcoRI schneidet [5' GAATT 3' (Pos. 1420 bis 1426)]). Die *Primer* die zum Klonieren verwendet wurden sind fett markiert und unterhalb der Matrixsequenz eingetragen. Die reversen *Primer* sind komplementär zur Zielsequenz dargestellt. Start- [5' ATG 3'] und Stopcodons [5' TAG 3'; 5' TAA 3'] sind eingerahmt.

E Anhang 3 - Ergebnisse

Anhang 3.1: Vergleich der hypothetischen Aminosäuresequenz von TLR2

Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	-----MGS[AMLVLI]FFSQ--GQSSTPEVEKRSTCDQ[CDERLFCN]C[SSSRNYRH]PTVTVTEVVTL[LLS]SFNDIT	66	
H.sap	-----MPHT[WMVWVL]GVIS--LSKEESS--NQASLS[CDNRNGIC]K[SSSGSLNS]PSGLTEAVKSL[LLS]NNRIT	65	
G.gal	MFNQSKQKPTMKL[WQAWLI]YTALAAHLPEEQAL--RQACLS[CDATQSCNCS]FMGLDFT[PPGLTGKITV]L[LAHNR]IK	76	
X.tro	-----MMQS[LSCLT]LSLVVTVL[SKGN]-----TDCPCDAAHFCH[CSSMHWEAL]PSGLPRDVRGL[LLS]N[AIQ]	63	
D.rer	-----MRLVGT[TAIIL]MFILAQGLECSQT-----CKDQ[QMYFCN]C[SSNNLHQ]PTVPS-DVLGL[LLS]SFNCIE	63	
P.oli	-----MGQQMIP[FTLLP]LLSLCGGQSSNPG---RPSCRS[CDLHLS]C[DCSRGQFTH]PTIVTS-RALT[LLS]SFNNIT	68	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	S[VAEDDL]REYTWL[RTLDL]HSNR[ESI]HEW[FHLLQ]GLES[LDLSYN]QLAALNP[AWFSKLLS]L[QHLN]L[LGSCY]RT[LG]PGG	144	
H.sap	Y[ISNSDL]QRVCNLQALVLT[SN]NTIEEDS[SSSLGS]LEH[LDLSYN]LSN[SSSWKPL]SSIT[FLNL]L[GNPYKT]LGET-	142	
G.gal	L[RTHDL]QKAVN[RTLL]QSNQ[SS]IDEDS[FGSGQKLE]LD[LDLSNN]SLAHL[SPVWF]G[PLFSL]Q[HLR]L[QGN]SYSD[IGES]-	153	
X.tro	I[VETDL]QPYDQ[LTLL]QYNA[HT]INDGS[FQPLGN]LE[LDLSYN]NLSH[SSAWERN]LYN[KLHL]L[LGNOYLT]IGNN-	140	
D.rer	S[INMTDL]SSYNE[LIILN]LHKNK[RHI]HRD[FKSQHN]LEVL[LDLSNN]NLSN[SPSWH]K[KLKSL]Q[QLN]V[GNPYST]VGPA-	140	
P.oli	M[VTDVDL]T[GH]ERL[RTLSL]HGNR[VAGIHPA]FDSLSW[LE]LD[LDLSHN]Q[ITSN]P[DW]QELGALL[RLNL]L[HN]P[RCV]GSS-	145	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	TL[SLFRS]L[RLRF]L[RF]GNPA-LEEVRRGD[AGV]RQLDQ[EVYGN]L[KRY]L[PGSL]GDLWP[GVVT]L[RLRG]P[FDNTTLV]	221	
H.sap	--SL[FSH]LTKLQ[ILRVGN]MDT[FTKI]QRKD[AGL]TFLE[EEIDAS]LQSY[EPKSL]KSIQN[VS]HLI[LMKQ]-----HILL	213	
G.gal	--SP[SSSR]NLSS[HLGN]PQ-FS[IR]RQGN[EGV]LNT[IRIDGN]L[SOY]L[PGSL]K[SIRK]N[HMIS]IRR-----IDVF	223	
X.tro	--SL[FAS]SS[LRSL]Q[FGNQD]-ESA[QKLH]ES[ERLNI]E[IKAA]L[GLY]EG[SLAAIKQ]N[HAV]TVN-----IQNL	209	
D.rer	--PI[SSSV]NLRTH[HLGSPS]-L[RELH]KNG[DV]LTHLDE[VTFFGS]L[RSY]NGS[LKAARP]G[SVS]L[QNL]FESD[PELV]	215	
P.oli	--P[VEHG]L[VRLRR]L[AFGGPA]-LE[IKMAA]L[SGV]TELET[TVHAN]L[SRYS]G[ALSYVWP]L[GCVT]L[SHGP]FLTN[MA]LA	220	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	SS[LIHDV]SYSET[LVVA]VL[SEKTS]VAPFRETNRRRV[SS]IMFQ[NATL]DE[FAIVH]FMEV[VDGAS]-DEF[LGVEDAT]H[HG]	298	
H.sap	LE[IFVDV]TSSVECT[ELR]D[DTDFH]FSELSTGETNSL[IKET]FRNVKI[DE]SLFQVMKL[NQISG]LE[LEFDDCT]H[NG]	291	
G.gal	SA[IVRDL]LHSAI[VEVR]EIK[LDIEN]EKLVQNSTLPTI[IKET]FGASF[DKYIS]QIAVL[KEIRS]RE[LEAIDC]V[EG]	301	
X.tro	RALLNDFVHSVTL[EMK]D[MQFG]DAADV[KAMVIL]NDTSI[KYLV]FRNCII[TDQ]SASRLLEI[QTYRN]ITD[FI]LDDST[LYG]	287	
D.rer	SK[VLDV]SHPETL[IIK]V[MTKT]NTSTEPFKMVKEGGT[KSIT]FQNSST[EDC]ALTSFLEF[VDGSP]-LSF[IGLEDI]Q[EVG]	292	
P.oli	SA[VLRD]VSYPETP[VLE]D[LHL]IGNRSTQPLRELAKRRV[NM]TERNL[SVSD]EATVSVIEI[LDGVP]-LTY[SIDGV]T[IG]	297	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	TG[SWTPAR]RT---HLDN[DTVY]RNIE[ENVYK]ETSFLP[VGFLK]NL[RQIS]IINCKVYV[MCLT]LLITQ[VYLD]D[SG]	373	
H.sap	VGNFRASDNDRVIDPGK[VETLT]RRLH[PRFY]LFDLST[YS]LTERVKRITVENS[KVFLV]PCLLS[QHLK]SL[EYLD]D[SE]	369	
G.gal	KCAWDMTEIARSQSS-[ETLS]TNMT[LDFY]LEFDIEG[ETQV]GKLK[RLS]IASSKVFMV[ECRLA]RYFSS[LYLD]D[HD]	378	
X.tro	TGTASPVIGD---DPFSV[TTAI]NKLH[PKF]FL[ESDL]QGYKLASNFKN[ACIDS]KVFLM[PCAF]RSFSS[LYLD]D[SG]	362	
D.rer	IGEWQKAKYT---HHDS[RTAY]RNIE[EGFFG]ESSMIE[LGFLK]H[FHNV]SVINATV[FVIR]KET[FLFKN]EYMD[ISQ]	367	
P.oli	EGRWEKASWA---DFHS[DEFF]Q[NIV]LDVFK[VSL]LR[KFLL]QYPRR[VS]VINSRM[FVIR]CDT[FLMSS]L[QYLD]D[SD]	372	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	NL[TDLT]TESLCHGIG--ILRN[LRVIN]SDNA[KSI]SLISKLVTRLDKL[VHLD]NSQNA[TSMP-PTCS]W[QIL]THLN	448	
H.sap	NL[VVEY]KNSACED---AWP[SLQTL]IRQNHLASLEKTGETLLTLKNLT[NID]SKNS[THSM]-ETCQWPEKMKYLN	442	
G.gal	NL[VNNR]GETICED---AWP[SLQTL]N[SKNS]KSLKQAA[YSISNL]HKLINLDR[ENN]GEIP-DMCEWPE[NKYLN]	451	
X.tro	NL[SDNL]ASSACAFEGGGAWPILQTLN[VS]RNLT[SLRRLA]QITSGLYLT[NLDV]SQNN[SGEL]STSTCQWPKSKYLN	440	
D.rer	NL[TDLT]QPTLYTGSG--AYQN[LNMN]V[SQNV]KSI[GLMSRL]VTN[KKLKYLD]SYNS[VSMP-EKCS]W[PTL]RELN	442	
P.oli	NL[TDMT]VETLCSKRG--ALKD[LRVN]SGNA[KSL]STLSRLVERLHKL[THLD]SRNF[SSMP-GSCS]W[PTL]RYLN	447	
Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578)			...
O.myk	LSRAKLRRT[PCLE]PTLE[LDLGH]NDLTA[FH]SVA[PA]RELH[LSGN]K[MSLP]PGWL[FPSK]KVLL[QSNT]NMF[GPLDL]	526	
H.sap	LSS[TRHS]VTGC[PKTLE]LDVSNNN[ILFS-LN]POLKELY[ISRN]KLMTLPDASL[PMELV]IK[SRNA]TTFSKEQL	519	
G.gal	LSS[QIPK]TTC[LEPT]LELDV[SANN]LQDFG-LQ[PPFL]KELYLT[KNHL]KTLPEATDIPNL[VAMS]SRNK[NSFS]KEEF	528	
X.tro	LSS[QMSN]IT-C[LEPT]LQLDVSSNYLTVFT-IK[PNLT]ELYI[SNRL]SKLPEGMYE[PREFM]LS[DRNK]NDFYQSDL	516	
D.rer	LSS[TKLST]T[PCLE]SSLT[LDLSEN]DLKAFK-QR[PHLT]TLTIL[GNRL]MKLPDGL[FPSL]NTLL[QRNA]RMFNQSSL	519	
P.oli	LISAKLIT[TPCL]PKTLE[LDLSNN]DLQGV[VA]PALREL[RLSGN]K[LLRL]PPGSWEPN[QTLT]QSNTNMF[DRSDL]	524	

Extrazelluläre Domäne: Leucin-reiche Region (Pos. M1-R578) ...		
O.myk	QLRRIRALQAGQNRFCVCSCEFNFMVWRWGGAVERGSVELTDRWDNYLCDSPLPLQGGQRDRVOLSPFQCHRIILLVSS	604
H.sap	DSHTLTLEAGGNNFICSCSEFTSFTQEQQ----ALAKVLIDWPANYLCDSPSHVRGQQQVDVRLSVSECHRTALVSG	593
G.gal	ESKQMEILLDASANNFICSCSEFTSIHHEA----GIAQVLVWGWPESYICDSPLTVRGAQVGSVQLSIMECHRSLLVSL	602
X.tro	DLFPQLTTLGRDNNYLCSCQFSEFMHSH-----TIALVGVWPDYICDSPPSSVRGKRQDANLPLVCHKTTLIVTL	587
D.rer	RSFKTLLYLEAGANNFVCSCKFVSEFKK----DVEDLITLQDGRQNYVCNTPFTRLGNATDSVRLSVFECMMIPAVSV	593
P.oli	RSFRLQLNLAQGNKFCVCHCDFVAFLLQSSIRGDED--VRLTGDGEESYICDSPPFHLQGGEPVQGIYLSFVLCHRDLEFVSL	600
Membrandomäne (Pos. T588- H610) TIR-Domäne ...		
O.myk	LCGCMIASGILFVILLWKIHAVVYVRMMWAWLKAQRNSGNQKRRDAAGNAYLLCYDAFVSYSYEQDAEWVEEFLVPELE	682
H.sap	MCCALFLLILLTGVLCHREHGIWYMKMMWAWLOAKRKPRKAP-----SRNICYDAFVSYSYERDAYWVENIMVQOLE	664
G.gal	ICTLVFLFILILVVVGKYHNAVYMRMTWAWLOAKRKPRKAP-----TKDICYDAFVSYSYENDSNWVENIMVQOLE	673
X.tro	SCILLIALVAAIAALCHFTHVWVYAKMTWAWLKAQRKPLKNC-----DREICYNFVSYSYERDSEWVENIMVPELE	658
D.rer	LCFGIITALGLVLTCHKLHVWYLOMTKAWIOAKRKPAVGRLEELR-----YDAFVSYSYQHDAEWVEEILVABLE	665
P.oli	CCGVALVVGILVCVLLWRDHALWYLRMMWAWLKAHSSRRRLRLNRLESEALLSYDAFVSYSYEDAGWVETELVPELE	678
TIR-Domäne (Pos. C640- S784) ...		
O.myk	DSQ-----PPTLCLHKRDFLPGHWIDNIIHAMERSRRTLFLVLSHFVHSEWCRYELFFSHFRIFDGDSD-	747
H.sap	NFN-----PPEKLCLHKRDFLPKGWIDNIIIDSEIKSHKTFVLSENFVKSEWCKYELFFSHFRIFDENN-	729
G.gal	OAC-----PPEKLCLHKRDFVPKGWIDNIIIDSEIKSHKTFVLSEHFVQSEWCKYELFFSHFRIFDENN-	738
X.tro	NAV-----PPEKLCLHKRDFVPKGWIDNIIIDAMEKSYKTFVLSEHFVRSEWCKYELFFSHFRIFDENN-	723
D.rer	DTQ-----PSESLCLHKRDFRPGRWIDNIIIDSEIKSYKTFVLSEHFVSSEWCRYELFFSHFRIFDEHN-	730
P.oli	EPRETDSDSVNHTDPRPPTLCLHKRDFLPGHWIDNIIISAMERSRRTLFLVLSQNFVQSDWCRYELFFSHFWLFDGDTDR	756
TIR-Domäne (Pos. C640- S784)		
O.myk	-EAAVLVLEPIISKDDVPFRFCKLRKIMSSRTYLEWFPQEDERRAEFWNNLELAVRGGDEL-----	806
H.sap	-DAAILLLEPIEKKAIPFRFCKLRKIMNKTYLEWPMDEAOREGFVWNLRAAIRS-----	784
G.gal	-DAAILLLEPIQSQAIIPFRFCKLRKIMNKTYLEWPPDEEQQMFENLKAALKS-----	793
X.tro	-DAAILLLEPIENETVPRFCKLRKIMNKTYLEWPTDEEQQEVFDNLKTAQSEY-----	780
D.rer	-DSAVLVLEPIKKETIPFRFCKLRKIMNSRTYLEWPEDEDKRDEFWSNLRALQREDEC-----	788
P.oli	GPAILLLEPIISKDDVPFRFCKLRKIMSSRTYLEWFPQEEERRGGEFWRSLRSALRGDEEDE-----	818

Abbildung Anhang 3.1: Alignment der TLR2-Aminosäuresequenzen

a) Die Sequenzen wurden mit dem *Onlinetool* NPS@: ClustalW aligniert. An den schwarz markierten Positionen haben alle Sequenzen die gleiche Aminosäure. Dunkelgraue oder hellgraue Markierungen bedeuten starke oder schwache chemische Äquivalenz. Die Positionen der Proteindomänen wurden von der humanen TLR2-Aminosäuresequenz abgeleitet.

b) Für das Aminosäure-Alignment wurden die folgenden Sequenzen verwendet: O.myk [CCK73195](#); H.sap [NP_003255](#); G.gal (*Gallus gallus*) [NP_989609](#); X.tro [XP_002933537](#); D.rer (*Danio rerio*) [NP_997977](#); P.oli [BAD01044](#).

Anhang 3.2 Hinweise auf weitere TLR2-Varianten

Wie unter Punkt 3.1.1.2 beschrieben konnte mit der „Genome Walker Methode“ unter der Nutzung von *Primer* TLR2_r7 [GGCATTGGAACGGTGAGAGC (Pos. 1890 bp bis 1909 bp; [HE979560](#))] ein Hinweis auf ein Intron gefunden werden (Abbildung Anhang 3.3).

Von dieser Sequenz wurden reverse *Primer* [TLR2_r8 5' GAGGATTCCCAGATTTCCTGCT 3' (Pos. 3191 bp bis 3212 bp), TLR2_r9 5' CCGGGTACATTCCCACAATTC 3' (Pos. 3214 bp bis 3234 bp) beide [LK933546](#)] abgeleitet und mit *forward Primern* [TLR2_f7 3' GCCTGAAGGTCCTCCTGATCC 3' (Pos. 1640 bp bis 1660 bp); TLR2_f8 5' GTTTGGGCCTTTGGACCTCC 3' (Pos. 1680 bp bis 1699 bp)] die von der cDNA des TLR2a ([HE979560](#)) abgeleitet wurden kombiniert.

[illegible]

Abbildung Anhang 3.3: Sequenz-Alignments zur Ermittlung der TLR2b-GenVariante

a) Sequenz aus dem Genome Walker mit dem *Primer* TLR2 r7

b) Validierung des Introns aus dem Genome Walker

Schwarz unterlegt sind die Intronbereiche der genomischen Sequenz. Sternchen stehen für Sequenzidentität. Die Rauten unter b) markieren Sequenzpolymorphismen die in unabhängigen Experimenten bestätigt wurden.

Mit allen *Primerpaarungen* konnte das 5'-Ende des Intron fünf bestätigt werden und gleichzeitig das Intron vier ermittelt werden. In beiden Introns zeigten sich Sequenzunterschiede, die das Vorhandensein weiterer Varianten des TLR2-Gens vermuten lassen. Die Polymorphismen im Intron vier konnten in unabhängigen PCRs bestätigt werden.

Die Suche nach weiteren TLR2-Varianten wurde an diesem Punkt aufgrund der scheinbar hohen Diversität nicht weiter verfolgt.

Die ermittelten und abgesicherten genomischen Sequenzen f7/r9 wurden genutzt um zumindest eine TLR2-Variante nach weiteren Introns zu durchsuchen. In 3'-Richtung konnte kein weiteres Intron identifiziert werden. Allerdings konnte mit der *Primerpaarung* [TLR2_f9 5' GCACGCTTATTTGTACGTTTATCT 3' (Pos. 2992 bp bis 3011 bp), TLR2_r10 5' TCGACTGCGTTCCATTGCAT 3' (Pos. 3849 bp bis 3868 bp beide LK933546)] der Zusammenhang der TLR2-Intronvariante mit dem alternativen 3'-Ende gezeigt werden. Mit dem *Primerpaar* [TLR2_f10 5' GTCTACCCCCGACCCTGGAG 3' (Pos. 1112 BP bis 1131 bp, HE979560), TLR2_r11 5' CAAAAATCAAAGGCAGGACCCTA 3' (Pos. 2653 bp bis 2675 bp; LK933546)] wurde das weiter in 5'-Richtung liegende Intron 3 gefunden. Nach erneuter *Primerableitung* [TLR2_f11 5' CCTTCCTGCCTGTGGGGTTT 3' (Pos. 1499 bp bis 1518 bp; HE979560), TLR2_r12 5' CTCTCTACCTAGGGAACAACCA 3' (Pos. 1474 bp bis 1495 bp, LK933546)] konnten auch die Introns 1 und 2 ermittelt werden.

Anhang 3.3: Funktionsnachweis des bovinen TLR2

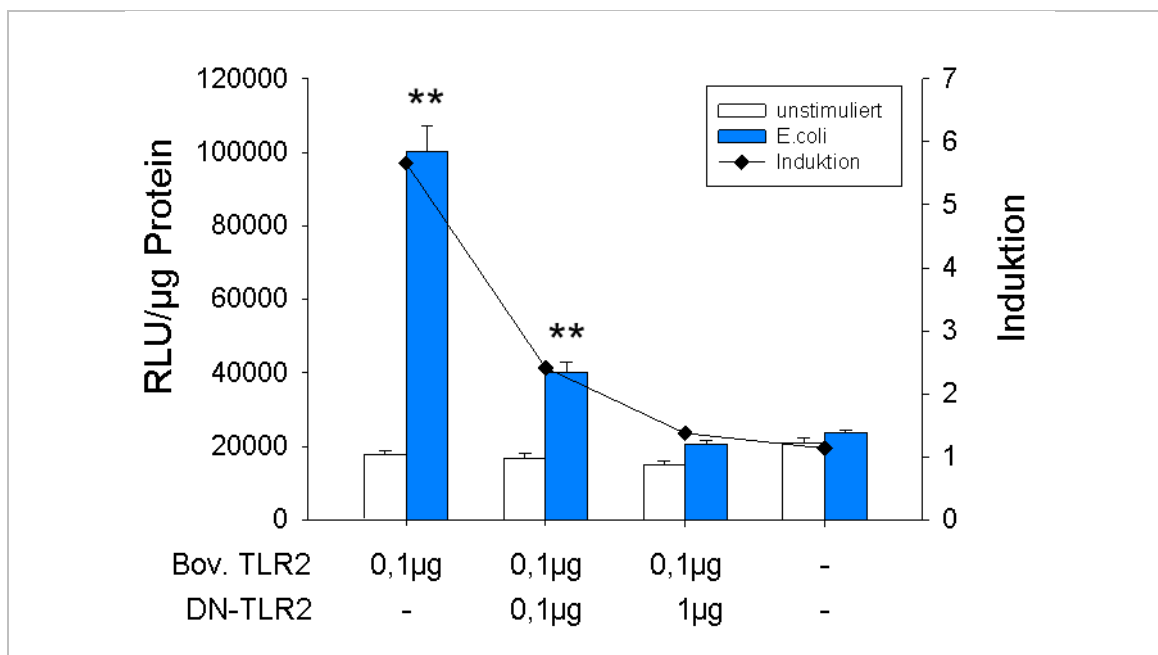


Abbildung Anhang 3.3: Funktionsnachweis für das bovine TLR2:

Die HEK-293-Zellen wurden mit den in der Abszisse angegebenen Mengen an Plasmid mit bovinem beziehungsweise mutiertem TLR2 kotransfiziert und für 24 h mit 30 μg/ml Hitze getöteter *E.coli* 1303 stimuliert. Die Ordinate gibt die RLUs der Luciferase im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration an.

Anhang 3.4: Vergleich der Aminosäuresequenz von IRAK4

Todesdomäne (Pos. T9-P106)		...
H.sap	M-NK-PITPSTYRCLNVLIRKLSDFIDPQ---EGWKKLAVAIK---KPSG--DDRYNQFHRRFEA--LLQTGKS	65
T.gut	M-GE-PVTDSTHVRCLSYGLVRRLLADFIDPQ---EGWKKLAVDIT---NPSG--ESRYSQVHRRFEA--FVQMCKS	65
X.tro	M-SK-TVTPSTYRNLSSGMHRQLADLLDPQ---EGWKKLAVNIM---KPSG--DARYSQFHRRFEG--TVQMCKS	65
O.myk	M-SN-TITSATFIRNLNYGVRRLSDLLDPQ---DSWKDVIVLIH---KPTG--EPRYSQQHLRRFEA--VVLQGRS	65
C.mar	M-SN-TITSATFIRNLNYGVRRLSDLLDPQ---DSWKVIVSIH---KPTG--EPRYSQQHLRRFEA--VVLQGRS	65
S.sal	M-SN-TITSATFIRNLNYGVRRLSGLLDPQ---DSWKDVIVSIH---KPTG--EPRYSQQHLRRFEA--VVLQGRS	65
P.alt	M-NH-TMTSSTLIRKLNYGIRRLSDFIDPQ---DSWKVIVSIH---KPTG--EPRYSQQHLRRFEA--YVSQCKS	65
D.rer	M-SD-VTENTPVRKLRYSALRALADLLDPQ---DTWRSIMADIS---KPCG--EPRYQMHRRFEA--CVLQCKS	64
T.rub	M-SN-SVTSATYIRNLSSYIRRLQSLGILDPQ---ERWKEITITISIT---KPNG--DFRYSQHNVRRFAG--LVAQCKS	65
B.flo	MP-PPPLDEKMYIRKMOYTTLMVMAMELDPEGQIKGWKDLASLIT---KGHCNNOPRYNVTMKMYMEY--MKRQCS	70
E.sco	MPLGKSITSNFIRQLPMSAYRNLENLLDPG---EMWTQLMENTP---QYLDSDNSPYRYTVODGLNIRKSQLKGRS	72
H.div	M-GGQKVTEDETFTRQLPYSAVAKLTSLLDPG---KQWEKLVNTPRKLGMLDQDEFVPEYDLTYVSMIDERGKMKGS	74
Todesdomäne (Pos. T9-P106)		
H.sap	PTSELLFDWGTNCTVGDLVDLLQNEFFAPASILLPDAPKPTANT-----	111
T.gut	PTCELLYDWGTNCTVADLVDLLRNQFIAPASILLPAVRMPDEV-----	112
X.tro	PTCELLYDWGTNCTVQDLKDLQKNGESAAASILLPAKN-----	105
O.myk	PTMELLNDWGTSNCTVGELVDILMSHRLMAAASILLPYAINNPR-PA-----	111
C.mar	PTMELLNDWGTSNSTVGELVDILMSHRLMAAASILLPDAINNPR-PA-----	111
S.sal	PTMELLNDWGTSNSTVGELVDILMSHRLMAAASILLPDAINNPR-PA-----	111
P.alt	PTMELLNDWGTNCTVGELVDILSHKFIAPASILLPDRVQAQASAS-----	112
D.rer	PTMELLFDWGTNCTVGDLVILIRHOLFAAVTVLLPDHVSCHTHTG-----	111
T.rub	PTBELLADWGTSNCTVGELVDILSHKLLAAAIIVLPDAIPAEAQQP-----	112
B.flo	PTALLLDWGTONTVQELVEVLLQGGYRVANMLIPGNR-----	110
E.sco	PTVLLLEDWGTQNPQIRHLTEVLRSELYAAADYLSVNVLKGPSVSRGGQSTFESHQCTEPTEQRSIDSCDSCWKISDS	150
H.div	STRLLLDWGTQNVRIKHLKVLVISELYAAADYLSVNVLGGEVPER-----PRLETPNGRTGQECQSES EDTCSA	144

H.sap	-----LPSKEAITVQOKQMPFCDKDRITLMTPV--QNLQSYMPDSSSPENKSLEV-----	160
T.gut	-----LPLSSQETLFIHKKQLPVQKKVASVKPVLAQSTEKHNSGSSYSSEENSSSSQS-----	165
X.tro	-----TENVNASTRPVSSAINAFCEMSAEVIDTCNPHITYQSKGPEENEVDDF-----	153
O.myk	-----VPQPPD-----SPRDKEMVGNSDAATRPLGRTEEQTKEQPPPDSTSEPOEDPEPNG-----	162
C.mar	-----VPQPSD-----SPRDKEMGNDAATRPLGRTEAQTKEQPPPDSTSEPOEDQTPND-----	162
S.sal	-----VPQPPD-----SPRDKGMVGNSDAATRPLGR-----TKEQPPPDSTSEPOEDQEPNG-----	158
P.alt	-----AVQPAI-----SASATORINN--TPITAMGES-----AQVSSTRNTEVQVQD-----	152
D.rer	-----SVWCEEAAPASAVCLQACEITQTVEDNSNKPQKISKPVEDDSNIPVQEQELFVEPDSSSGAQ	173
T.rub	-----DPSAEITYSALPTRLIDNKGTQVVESSAP-----TQIQLDSCDPEE-----	153
B.flo	-----DTVIFVITVKNSTFDLMWCN-----VVFPPFSPNSNVVVLRCRMS-----	151
E.sco	KPEEPIESSLDSKCETANITSLSGSIDSKPDPKSLKLIGSPPTTTSPTTPTNEQKCEATENDETEQVKE-KFKKI	227
H.div	KEYEDRGTIYVRKHGEDQALSETPESFESLSEEMRLSLRSLGPSADLK--SGPSLGSTRAPGESDEIAEEEE-VLRQL	219

Kinasedomäne (Pos. G193-I380) ...

H.sap	-----SDIRFHSSEYELKNVTNFDERPISVGGNKMGEGGFGVYKGYINN-TTVAVKKLAAMVDITTEELKQQFDQ	232
T.gut	-----SNIDFQNLIFHLESITNFDAREPSAGGNKLGEGGFGIVFKGYING-KNVAVKKLIAMVDVSVQDLKQQFEQ	237
X.tro	-----DDMGITGRSETEVKQSTNFDIRPVSEGGNKLGEFGFVVEKGEIKE-KIVAVKKLTETVDASIQDLICQFEQ	225
O.myk	-----TAGFLRLSFHELKKITGHFDERPVSEGGSRLEGGGFGTVYKGLING-KPVAVKKLHSMEDISLEELSVQFIQ	233
C.mar	-----TAGFLRLSFHELKKITGFDERPVGGGSRLEGGGFGTVYKGLIND-KPVAVKKLHSMEDISLEELSVQFIQ	233
S.sal	-----TAGFLRLSFHELKKITGHFDERPVSIDGGSRLEGGGFGTVYKGLING-KPVAVKKLHSMEDISLEELSVQFIQ	229
P.alt	-----SGFERSEYELERITEKFDNRNISEGGSRLEGGGFGTVYKGLING-KPVAVKKLHSMEDISLEELRAQFNQ	222
D.rer	ESSWDSGCGFHTPSLHELTAHTCHDERPISGGGSRLEGGGFGVVEGRVGD-KPVAVKKLNPLDGSSYEELRKQFNQ	250
T.rub	-----ESFSSSYNDLIKITDGFNDRPVSEGGSRLEGGGFGVYKGVINH-KPVAVKKLIPVEDMSLEELQIQFHQ	223
B.flo	-----IVQFVDRRTTELQRTITNGFNDFFPSKQGNLLEGAFGTVYKGLTASGTAVAVKLLKPKTDQMTQHASKAFTQ	223
E.sco	DMGDIPQEHCPRLAYDVLKEMTDNFNDKDIISGGRLLEGGGFGVYLG-VRSDLNAVKKLFDTST---PEETKLEET	300
H.div	HGNES--ILLRLDFFKMLKHVTNMFNETEMSKGNLLEGGGFGTVELGQNNNGFKIYVKKLKEEN---ENNMKQFHT	291

Kinasedomäne (Pos. G193-I380) ...

H.sap	EIKVMACSHENLVELLGFSSSDG-DDLCLVYVYMGNSLLDRLCLDGLPPLSWHRRCLIAQGTANGINFLHNNHHH	309
T.gut	EINIMAKCSHENLVELLGFSSSDG-AQPCLVYVEYMGNSLLDRLACLDETPPTPWMMRCKIYQGTANGINFLHNNHHH	314
X.tro	EIKIMGKCSHENLVKLLGSSKDG-DQYCLVYTYMGNSLLDRLACLNDTPPTISWVLRONTIYGTANGINYLHNSHHVH	302
O.myk	EVQTLMLKHENLVDMVGFSRDG-HHPCLVYAYMSNGSLLDRLACLGDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGLDYLHNNHHVH	310
C.mar	EVQTLMLKHENLVDMVGFSRDG-HHPCLVYAYMSNGSLLDRLACLGDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGLDYLHNNHHVH	310
S.sal	EVQTLMLKHENLVDMVGFSRDG-HHPCLVYAYMSNGSLLDRLACLGDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGLDYLHNNHHVH	306
P.alt	EVQTLMLTSHENLVDMVGFSRDD-HCPCLVYAYMSNGSLLDRLACLGDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGLDYLHNNHHVH	299
D.rer	EIQTLRSLSHENLVRLGSCSCG-PPLCVFELVMNGSLLDRLACAEHTFALTWNRCWIVGARGLSYLHTAHHH	327
T.rub	EIQTLTLVLSHENLVDMVGFSRDG-QYPCVLYPLMGNSLLDRLACLGLPPLSWHRRCLIAEGTASGLEFVHRNHHVH	300
B.flo	EVNLSRFSHENLVPLIGSIDNFCPCLVLYLYMGNSLQDRACKDGKPPPLTWLARLAIQGTAAAGVCHLHEHEVH	301
E.sco	ELQVLSKFSHENLVSLIGSSCG-PKFCLVYTYMGNSLQDRACKNDIPLVQQRIDIAKGTAGIHYLNSNVVH	376
H.div	ELNVLISKYSHENLVHLGVCRED-ANHCLTYEYMSNGSLEERLCKNEKPLSCPMRLSIAQGTARGINYLNQGEVH	368

Kinasedomäne (Pos. G193-I380)

H.sap	RDVKSANILLDEATAKISDFGLARASEKFA-QTVMTS-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	385
T.gut	RDVKSANILLDTYVVPKISDFGLARASVFT-QTVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	390
X.tro	RDVKSANILLDDTLVPKISDFGLARATGQFS-KTVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLA	378
O.myk	RDVKSANILLDELVPKISDFGLTRASATRSSATVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	387
C.mar	RDVKSANILLNELVPKISDFGLTRASATRSSATVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	387
S.sal	RDVKSANILLDELVPKISDFGLTRASATRSSATVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	383
P.alt	RDVKSANILLDDKLVAKISDFGLTRASATRSSATVMTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	376
D.rer	RDVKSANILLDEGLVAKISDFGLTRASATGSLMTQTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	404
T.rub	RDVKSANILLDEKLVAKISDFGLTRASATPKGTSTVMKTE-RIVGTTAYMAFEALRGEITPKSDIYSFGVVLEIITGLP	377
B.flo	RDVKSANILLDRNNTAKVDFGLVRVVPSEA-TSQOTT-TVFGTVYMAFEALRGEVSPKIDTYSFGVVLEIITGLP	377
E.sco	RDVKSANILLDEHLPKVGDFATARKSPKDMTSIFTR--VVTGTAYMAFEAYCHEVSVKLDYSISFGVVLEIITGLP	452
H.div	RDVKSANILLDDLPKVGDFATARLAPKGTGTFTQTMVVIIGTAYMAFEALRGEVSAKLDIYSFGVVLEIITGLP	446

H.sap	AVDEHREPOILLDIKKEIEDE--EKTIEDVIDKKMNDAPSTSVEMYSVASOCLHEKKNKRPDIKKVQQLQOEMTAS--	460
T.gut	PVDENREPOILLTKDEIEDE--EATIEDVDVKMSDWDVPSHTMYSTADRCLNDKKNRPDIMMVQQLOEIKT--	464
X.tro	PVDENRSPSILLDIKKEIEE--EKTIEEYTDKKMGDVFPNTLKKMYTASOCLNCKMKNRPVITRVLQNLLEDIKNLV	454
O.myk	PVDENRDPKFLMEMKDEIDEE--EMALEDFVDKKMTDWDLPVVERTYFLASDCLSDKKNKRPIMEEVLTELEDVVKSI	463
C.mar	PVDENRDPKFLMEMKDEIDEE--EMALEDFVDKMTYWDLPVETTYFLSDCLDKKKNKRPMEEVLTLEDVVKSI	463
S.sal	PVDENRDPKFLMEMKDEIDEE--EMALEDFVDKKMTDWDLPVVERTYFLASDCLSDKKNKRPMEEVLTLEDVVKSI	459
P.alt	PVDENRDPKFLMEMMAEIDEE--EQTLEDFVDKKMSDLEMPQAEQAFTLACNCLCDKKNKRPVIKQVMELEELIKGI	452
D.rer	PVDESRRDPALLKEMKDDIDEE--DLSLIDFTDKRMQDWRTEELQIMYEASOCLCKKKNKRPAAVLSVLEDLHKV	480
T.rub	PVDENHNPKFLMEMPSAIDEEDEELTFEGEIDTKMEDVQLGQAESVYTLACSCLCDKKNRPVSKOEPATEEQLPGE--	454
B.flo	GWKENEKD--LVSWVEDVCEE--AEDILPHVDPQAGEATPTLVTAFTLSTQCLEYKKKTRPEMVTVKKNLDCI----	447
E.sco	VFDYKRDDRDILKSHISEHCDK--VDDIYDFVDVSAGTWPKHIEAFYNTSMKCLYDRKKERATADIMPEMOSITLVN	528
H.div	SFDEEREDRDLSHMOENC-----EDIMDNVDLAGSWKEETAAMYNATASCLAK-KKKRPLLEDILPELENLSN--	516
H.sap	-----	460
T.gut	-----	464
X.tro	SSS-----	457
O.myk	SLEQLGPPQSEA	474
C.mar	SLEQLGPPMSDA	474
S.sal	SLEQLGPPQSEA	470
P.alt	SLGTHMSISEA	463
D.rer	ISR-----	483
T.rub	-----	454
B.flo	-----	447
E.sco	LCVTSTSC--	537
H.div	-----	516

Abbildung Anhang 3.4: Alignment der IRAK4-Aminosäuresequenzen

a) Die Sequenzen wurden mit dem *Onlinetool* NPS@: ClustalW aligniert. Sequenzidentitäten und auch chemische Äquivalenzen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz der Regenbogenforelle. An den schwarz markierten Positionen haben die Sequenzen die gleiche Aminosäure. Dunkelgraue oder hellgraue Markierungen bedeuten starke oder schwache chemische Äquivalenz. Die Positionen der Proteindomänen wurden von der humanen IRAK4-Aminosäuresequenz abgeleitet.

b) Für das Aminosäure-Alignment wurden die folgenden Sequenzen verwendet: H.sap [NP_057207](#); T.gut (*Taeniopygia guttata*) [XP_002194205](#); X.tro [NP_001116877](#); O.myk [CBI63173](#); C.mar (*Coregonus maraena*) [CBI63174](#); S.sal (*Salmo salar*) [CBI63177](#); P.alt (*Plecoglossus altivelis*) [BAH58736](#); D.rer [AAT37635](#); T.rub (*Takifugu rubripes*) [XP_003967681](#); B.flo (*Branchiostoma floridae*) [XP_002601719](#); E.sco (*Euprymna scolopes*) [AAY27972](#); H.div (*Halotis diversicolor*) [ADC53123](#).

Anhang 3.5 Tabelle: Referenznummern (NCBI, Ensemble) der verwendete Sequenzen

Spezies (Trivial)	Gen	DNA	cDNA	As
<i>Alligator mississippiensis</i> (Mississippi-Alligator)	<i>TLR2</i>			XP_006264586
<i>Anas platyrhynchos</i> (Stockente)	<i>TLR2</i>			XP_005021000
<i>Andrias davidianus</i> (Chinesischer Riesensalamander)	<i>TLR2</i>			AHB18364
<i>Bos taurus</i> (Hausrind)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i> <i>IRAK1</i> <i>IRAK2</i> <i>IRAK3</i>		EU746464	ACH92793 NP_001069466 AAI08133 NP_001069164 NP_001177228
<i>Branchiostoma floridae</i> (Lanzettfischen)	<i>IRAK4</i>		XM_002601673	XP_002601719
<i>Chelonia mydas</i> (Suppenschildkröte)	<i>TLR2</i>			EMP24917
<i>Coregonus maraena</i> (Ostseeschnäpel)	<i>IRAK4</i>	FN598581	FN598576	CBI63174
<i>Cynoglossus semilaevis</i> (Hundszunge)				ACU80549
<i>Cyprinus carpio</i> (Gemeiner Karpfen)	<i>TLR2</i>			ACP20793
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i> <i>IRAK1</i> <i>IRAK3</i>	CU467110	NM_212812 AY616584	XP_005170910 AAT37635 ENSDARP000000118154 XP_003198307
<i>Euprymna scolopes</i> (Zwergtintenfisch)	<i>IRAK4</i>		AY956810	AAY27972
<i>Gadus morhua</i> (Dorsch)	<i>IRAK4</i>			ADG85742
<i>Gallus gallus</i> (Haushuhn)	<i>TLR2</i>	AB046119	JN544171	NP_989609
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Dreistachliger Stachelhäuter)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i> <i>IRAK1</i> <i>IRAK3</i>		ENSGACT00000024730	ENSGACP00000024681 ENSGACP00000005317 ENSGACP00000001480 ENSGACP00000025500
<i>Halotis diversicolor</i> (Vielfarbiges Seeohr)	<i>IRAK4</i>		GU351882	ADC53123
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i> <i>IRAK1</i> <i>IRAK2</i> <i>IRAK3</i>	NT_029419 AY186092	NM_003264 NM_001114182	AAH33756 NP_057207 NP_001020413 NP_001561 NP_009130
<i>Ictalurus punctatus</i> (Getüpfeltes Gabelwels)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i>		HQ677714	AEI59663 NP_001188114
<i>Latimeria chalumnae</i> (Komoren-Quastenflosser)	<i>TLR2</i>			XP_006004927
<i>Macropus eugenii</i> (Derbywallaby)	<i>TLR2</i>			ENSMEUP00000007333
<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)	<i>TLR2</i>			NP_036035
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	<i>TLR2a</i> <i>TLR2b</i> <i>TLR2b</i> TVX1 <i>IRAK4</i> <i>IRAK4s</i> <i>IRAK3</i>	LK933545 LK933546 LK933547	HE979560 FN598575	CCK73195 CBI63173
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	<i>TLR2</i> <i>IRAK4</i>		ENSORLT00000003160	CCT61383 XP_004079601 XP_004069560

Spezies (Trivial)	Gen	DNA	cDNA	As
<i>Paralichthys olivaceus</i> (Falscher Heilbutt)	<i>TLR2</i>	AB109395	AB109393	BAD01044
<i>Petromyzon marinus</i> (Meerneunauge)	<i>TLR2</i>			ENSPMAP000000011399
	<i>IRAK4</i>			ENSPMAP00000000237
	<i>IRAK1</i>			ENSPMAP00000008349
	<i>IRAK3</i>			ENSPMAP00000001639
<i>Plecoglossus altivelis</i> (Ayu)	<i>IRAK4</i>	AB_469845	AB469846	BAH58736
<i>Salmo salar</i> (Atlantischer Lachs)	<i>IRAK4</i>	FN598579; FN_598580	HG422172	CBI63177
<i>Sarcophilus harrisii</i> (Beutelteufel)	<i>TLR2</i>			XP_003773178
<i>Taeniopygia guttata</i> (Zebrafink)	<i>TLR2</i>			XP_002196402; XP_002198506
	<i>IRAK4</i>		XM_002194169	XP_002194205
	<i>IRAK2</i>			XP_002187461
<i>Takifugu rubripes</i> (Japanischen Kugelfisch)	<i>TLR2</i>			XM_003976870
	<i>IRAK4</i>		XM_003967632	XP_003967681
	<i>IRAK1</i>			ENSTRUP00000016336
<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Grüner Kugelfisch)	<i>TLR2</i>			CAF90327
	<i>IRAK4</i>			ENSTNIP00000019071
	<i>IRAK1</i>			ENSTNIP00000007783
<i>Xenopus tropicalis</i> (Krallenfrosch)	<i>TLR2</i>	AC149070	XM_002933491	XP_002933537
	<i>IRAK4</i>		NM_001123405	NP_001116877
	<i>IRAK1</i>			NP_001006713
	<i>IRAK2</i>			NP_001007501
<i>Xiphophorus maculatus</i> (Platy)	<i>IRAK1</i>			ENSXMAP00000003526

Anhang 3.6 Tabelle: Zytokinexpression nach Infektion mit *A. Salmonicida*

Gen	Gewebe	n-fache Veränderung der mRNA-Kopienzahl				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IL1B	Milz	39,35 ± 12,98	47,80 ± 13,94	7,54 ± 2,33	8,89 ± 2,64	3,63 ± 1,04
	Kopfnieren	180,12 ± 75,62	393,18 ± 95,32	17,50 ± 7,97	17,39 ± 5,72	28,38 ± 8,11
	Leber	68,47 ± 26,01	151,60 ± 42,63	19,35 ± 6,24	22,21 ± 8,50	81,23 ± 32,69
	Thymus	3,36 ± 0,73	9,74 ± 2,93	2,00 ± 0,57	1,63 ± 0,35	2,75 ± 0,66
TNF	Milz	8,68 ± 4,55	7,76 ± 2,34	-1,16 ± 0,37	1,12 ± 0,30	1,82 ± 0,52
	Kopfnieren	2,06 ± 0,70	11,94 ± 4,32	-1,18 ± 0,53	-1,31 ± 0,26	1,64 ± 0,38
	Leber	21,10 ± 13,46	11,58 ± 4,93	3,74 ± 1,68	8,50 ± 4,33	10,88 ± 5,68
	Thymus	1,18 ± 0,28	2,10 ± 0,74	-1,27 ± 0,36	-1,13 ± 0,15	1,54 ± 0,25
IL8	Milz	27,85 ± 11,11	14,92 ± 4,55	4,30 ± 1,31	13,37 ± 6,27	17,80 ± 6,48
	Kopfnieren	26,59 ± 9,13	19,11 ± 5,15	7,24 ± 1,89	13,14 ± 4,92	24,12 ± 7,00
	Leber	60,14 ± 24,25	25,32 ± 13,09	9,30 ± 3,11	71,70 ± 55,32	39,32 ± 22,19
	Thymus	1,13 ± 0,31	1,33 ± 0,48	-1,38 ± 0,35	-1,14 ± 0,52	1,25 ± 0,28
IL10	Milz	1,24 ± 0,33	1,26 ± 0,27	1,46 ± 0,41	1,19 ± 0,35	1,29 ± 0,38
	Kopfnieren	20,39 ± 9,00	54,04 ± 18,64	10,35 ± 4,94	11,83 ± 6,24	15,53 ± 6,49
	Leber	2,52 ± 0,88	3,19 ± 1,12	3,08 ± 0,84	3,20 ± 0,95	3,63 ± 1,14
	Thymus	1,51 ± 0,52	1,59 ± 0,50	1,41 ± 0,47	1,41 ± 0,38	1,15 ± 0,32
TGFB1	Milz	1,11 ± 0,08	-1,05 ± 0,09	1,14 ± 0,15	1,04 ± 0,11	-1,06 ± 0,12
	Kopfnieren	1,17 ± 0,12	1,10 ± 0,09	1,14 ± 0,12	1,06 ± 0,14	-1,11 ± 0,13
	Leber	1,34 ± 0,14	1,50 ± 0,18	2,17 ± 0,35	1,76 ± 0,24	1,50 ± 0,20
	Thymus	-1,13 ± 0,16	-1,40 ± 0,22	-1,42 ± 0,33	-1,21 ± 0,24	-1,06 ± 0,16

Der Verlauf der Zytokinexpression wird hier durch die n-fachen mRNA-Kopienzahlen zu den Infektionszeitpunkten im Vergleich zu denen der 0 h-Kontrollgruppe dargestellt. Neben dem Induktionsfaktor ist mit einem ± der SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden in fetten Zahlen eingetragen. Signifikante Hochregulierungen wurden rot unterlegt, Abregulation grün.

Anhang 3.7 Tabelle: Infektionsabhängige Expression der PRRs

Gen	Gewebe	n-fache Veränderung der mRNA-Kopienzahl				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TLR1	Milz	-1,07 ± 0,19	-1,02 ± 0,23	1,07 ± 0,16	-1,07 ± 0,18	-1,54 ± 0,28
	Kopfnieren	1,61 ± 0,18	1,72 ± 0,25	1,50 ± 0,27	1,57 ± 0,21	1,66 ± 0,13
	Leber	-1,11 ± 0,18	1,72 ± 0,31	2,32 ± 0,56	1,67 ± 0,31	1,70 ± 0,22
	Thymus	-1,31 ± 0,29	-1,20 ± 0,32	1,21 ± 0,29	1,13 ± 0,24	1,09 ± 0,20
TLR2*	Milz	-1,13 ± 0,16	-1,73 ± 0,33	-1,86 ± 0,41	-1,46 ± 0,15	-1,68 ± 0,20
	Kopfnieren	1,24 ± 0,19	-1,13 ± 0,17	-1,68 ± 0,28	-1,10 ± 0,22	-1,18 ± 0,15
	Leber	-1,01 ± 0,11	-1,11 ± 0,11	-1,01 ± 0,12	1,50 ± 0,32	1,16 ± 0,18
	Thymus	-1,12 ± 0,21	-1,07 ± 0,19	-1,07 ± 0,25	1,16 ± 0,19	1,22 ± 0,16
TLR3	Milz	-1,58 ± 0,17	-1,67 ± 0,25	-1,21 ± 0,25	-1,82 ± 0,23	-1,70 ± 0,23
	Kopfnieren	-1,52 ± 0,17	-1,99 ± 0,26	-2,49 ± 0,30	-2,08 ± 0,29	-2,09 ± 0,32
	Leber	-1,21 ± 0,31	-1,64 ± 0,39	-1,40 ± 0,36	-1,83 ± 0,47	-1,64 ± 0,51
	Thymus	-1,26 ± 0,27	-1,87 ± 0,49	-1,46 ± 0,37	-1,52 ± 0,37	-1,63 ± 0,34
TLR5	Milz	-2,77 ± 0,71	-3,88 ± 0,71	-2,76 ± 0,70	-2,34 ± 0,66	-1,61 ± 0,49
	Kopfnieren	-1,07 ± 0,27	1,03 ± 0,64	-2,33 ± 0,48	-1,62 ± 0,47	-1,55 ± 0,34
	Leber	1,28 ± 0,31	-1,30 ± 0,25	1,77 ± 0,37	1,99 ± 0,37	1,96 ± 0,38
	Thymus	1,14 ± 0,23	-1,12 ± 0,29	-2,08 ± 0,35	-1,29 ± 0,30	-1,91 ± 0,52
TLR7	Milz	-2,10 ± 0,24	-1,62 ± 0,58	-2,79 ± 0,48	-3,23 ± 0,62	-3,40 ± 0,85
	Kopfnieren	1,95 ± 0,45	2,22 ± 0,63	1,51 ± 0,49	-1,28 ± 0,35	-1,04 ± 0,24
	Leber	-1,01 ± 0,23	1,06 ± 0,19	1,17 ± 0,20	1,33 ± 0,41	-1,05 ± 0,30
	Thymus	-1,30 ± 0,28	-1,34 ± 0,33	-1,03 ± 0,40	-1,35 ± 0,28	-1,47 ± 0,31
TLR8a1	Milz	-2,03 ± 0,29	-1,76 ± 0,28	-1,29 ± 0,20	-1,36 ± 0,23	-1,62 ± 0,29
	Kopfnieren	-1,35 ± 0,22	-1,89 ± 0,39	-1,90 ± 0,34	-1,30 ± 0,45	-1,89 ± 0,77
	Leber	1,47 ± 0,41	1,81 ± 0,42	2,86 ± 0,77	2,88 ± 1,00	1,67 ± 0,43
	Thymus	1,02 ± 0,21	-1,01 ± 0,27	-1,09 ± 0,28	1,15 ± 0,28	-1,41 ± 0,30
TLR8a2	Milz	-2,45 ± 0,53	-1,99 ± 0,29	-1,49 ± 0,27	-1,85 ± 0,32	-2,75 ± 0,45
	Kopfnieren	-1,31 ± 0,43	-1,46 ± 0,31	-1,23 ± 0,24	-1,29 ± 0,27	-1,91 ± 0,31
	Leber	1,54 ± 0,50	1,75 ± 0,56	2,30 ± 0,56	2,56 ± 0,81	1,54 ± 0,42
	Thymus	1,07 ± 0,27	-1,49 ± 0,33	-1,27 ± 0,32	1,03 ± 0,45	-1,28 ± 0,47

Gen	Gewebe	n-fache Veränderung der mRNA-Kopienzahl				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TLR9	Milz	1,09 ± 0,11	1,32 ± 0,11	1,44 ± 0,17	1,20 ± 0,22	-2,00 ± 0,25
	Kopfnieren	1,33 ± 0,19	1,35 ± 0,25	1,24 ± 0,21	1,29 ± 0,18	1,43 ± 0,17
	Leber	1,50 ± 0,22	1,95 ± 0,32	2,57 ± 0,42	2,87 ± 0,52	3,44 ± 0,51
	Thymus	-1,22 ± 0,37	-1,20 ± 0,40	1,15 ± 0,26	1,20 ± 0,39	1,33 ± 0,42
TLR19	Milz	-1,22 ± 0,28	-1,66 ± 0,59	-1,62 ± 0,46	1,45 ± 0,38	-2,82 ± 0,66
	Kopfnieren	3,18 ± 0,84	2,52 ± 0,54	2,73 ± 0,85	2,19 ± 0,64	2,00 ± 0,55
	Leber	2,83 ± 1,53	-1,82 ± 0,59	1,00 ± 0,23	-1,90 ± 0,54	-2,00 ± 0,57
	Thymus	1,06 ± 0,39	-1,22 ± 0,37	1,35 ± 0,55	1,02 ± 0,30	1,42 ± 0,43
TLR20	Milz	-1,58 ± 0,29	-1,71 ± 0,38	-1,23 ± 0,21	1,08 ± 0,27	-1,02 ± 0,25
	Kopfnieren	1,29 ± 0,20	-1,40 ± 0,21	1,07 ± 0,17	1,24 ± 0,18	1,49 ± 0,21
	Leber	1,55 ± 0,23	1,74 ± 0,20	2,01 ± 0,19	2,20 ± 0,25	2,02 ± 0,26
	Thymus	-1,17 ± 0,24	1,32 ± 0,35	-1,22 ± 0,32	1,19 ± 0,26	1,42 ± 0,31
TLR21	Milz	-1,39 ± 0,28	-3,82 ± 0,46	-1,83 ± 0,40	-1,25 ± 0,35	-1,03 ± 0,19
	Kopfnieren	-1,06 ± 0,26	-2,96 ± 0,61	-3,36 ± 0,51	-1,65 ± 0,26	-1,52 ± 0,24
	Leber	1,67 ± 0,48	1,61 ± 0,44	1,34 ± 0,21	2,16 ± 0,58	1,51 ± 0,34
	Thymus	1,07 ± 0,18	-1,31 ± 0,26	-1,47 ± 0,29	1,00 ± 0,21	-1,13 ± 0,21
TLR22a1	Milz	1,21 ± 0,27	-1,18 ± 0,22	-1,10 ± 0,23	1,01 ± 0,27	-1,99 ± 0,45
	Kopfnieren	1,55 ± 0,50	1,41 ± 0,34	1,51 ± 0,56	1,06 ± 0,24	-1,75 ± 0,44
	Leber	2,12 ± 0,52	1,94 ± 0,43	2,50 ± 0,58	3,23 ± 1,00	1,41 ± 0,34
	Thymus	1,24 ± 0,21	-1,11 ± 0,29	1,11 ± 0,35	1,07 ± 0,23	-1,46 ± 0,23
TLR22a2	Milz	3,02 ± 0,64	1,21 ± 0,24	1,11 ± 0,11	1,89 ± 0,39	1,53 ± 0,30
	Kopfnieren	6,14 ± 2,37	3,81 ± 0,70	1,63 ± 0,32	3,27 ± 0,70	2,71 ± 0,48
	Leber	3,51 ± 0,79	4,41 ± 0,97	2,94 ± 0,85	3,85 ± 0,97	3,12 ± 0,80
	Thymus	1,37 ± 0,25	1,83 ± 0,33	1,48 ± 0,40	1,23 ± 0,34	1,15 ± 0,28
NOD1	Milz	-1,05 ± 0,15	-1,60 ± 0,20	-1,01 ± 0,14	1,07 ± 0,12	-1,13 ± 0,13
	Kopfnieren	-1,22 ± 0,23	-3,08 ± 0,61	-1,60 ± 0,26	-1,31 ± 0,32	-1,59 ± 0,35
	Leber	1,20 ± 0,18	1,26 ± 0,19	1,37 ± 0,19	1,36 ± 0,30	1,74 ± 0,34
	Thymus	-1,02 ± 0,21	1,45 ± 0,33	1,35 ± 0,39	-1,04 ± 0,27	-1,15 ± 0,26

Der Verlauf der Expression wird hier durch die n-fachen mRNA-Kopienzahlen zu den Infektionszeitpunkten im Vergleich zu denen der 0 h-Kontrollgruppe dargestellt. Neben dem Induktionsfaktor ist mit einem ± der SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden in fetten Zahlen eingetragen. Signifikante Hochregulierungen wurden rot unterlegt, Abregulation grün.

Anhang 3.8 Tabelle: Infektionsabhängige Expression der nachgeschalteten Faktoren

Gen	Gewebe	n-fache Veränderung der mRNA-Kopienzahl				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
MYD88	Milz	1,44 ± 0,25	1,68 ± 0,24	1,33 ± 0,33	1,36 ± 0,22	1,25 ± 0,20
	Kopfnieren	1,37 ± 0,16	1,33 ± 0,20	1,22 ± 0,22	1,45 ± 0,29	1,04 ± 0,12
	Leber	2,75 ± 0,48	6,68 ± 0,63	3,34 ± 0,76	4,37 ± 1,48	6,78 ± 1,89
	Thymus	1,08 ± 0,14	-1,13 ± 0,23	1,01 ± 0,21	1,09 ± 0,17	1,00 ± 0,14
IRAK4a	Milz	-1,02 ± 0,14	-1,20 ± 0,10	1,26 ± 0,09	1,03 ± 0,16	-1,06 ± 0,14
	Kopfnieren	1,04 ± 0,11	-1,25 ± 0,16	-1,36 ± 0,19	-1,31 ± 0,18	-1,39 ± 0,19
	Leber	1,38 ± 0,14	1,67 ± 0,14	1,87 ± 0,24	1,51 ± 0,15	1,86 ± 0,23
	Thymus	1,17 ± 0,16	1,10 ± 0,18	1,08 ± 0,18	1,26 ± 0,17	1,71 ± 0,23
IRAK1	Milz	2,81 ± 0,43	2,86 ± 0,24	1,56 ± 0,17	1,51 ± 0,22	1,13 ± 0,20
	Kopfnieren	2,24 ± 0,35	2,54 ± 0,47	1,23 ± 0,15	1,34 ± 0,17	1,55 ± 0,18
	Leber	2,60 ± 0,50	3,93 ± 0,49	2,12 ± 0,35	2,14 ± 0,30	2,34 ± 0,34
	Thymus	1,11 ± 0,13	-1,07 ± 0,19	-1,25 ± 0,21	-1,14 ± 0,16	1,13 ± 0,15
TRAF6	Milz	1,10 ± 0,15	1,29 ± 0,13	1,26 ± 0,13	1,21 ± 0,16	1,15 ± 0,13
	Kopfnieren	1,05 ± 0,09	1,49 ± 0,15	1,36 ± 0,14	1,57 ± 0,15	1,37 ± 0,15
	Leber	1,27 ± 0,09	2,21 ± 0,27	2,21 ± 0,30	2,04 ± 0,33	2,17 ± 0,25
	Thymus	1,18 ± 0,15	-1,04 ± 0,11	-1,01 ± 0,15	-1,03 ± 0,13	1,78 ± 0,22
TOLLIP	Milz	1,06 ± 0,19	1,21 ± 0,21	1,29 ± 0,22	1,15 ± 0,23	1,24 ± 0,21
	Kopfnieren	1,31 ± 0,21	-1,05 ± 0,24	1,14 ± 0,12	1,27 ± 0,14	1,11 ± 0,10
	Leber	1,62 ± 0,48	1,73 ± 0,54	2,74 ± 0,87	3,44 ± 1,14	4,53 ± 1,43
	Thymus	1,03 ± 0,15	-1,11 ± 0,29	1,05 ± 0,24	-1,04 ± 0,19	1,29 ± 0,26

Der Verlauf der Expression wird hier durch die n-fachen mRNA-Kopienzahlen zu den Infektionszeitpunkten im Vergleich zu denen der 0 h-Kontrollgruppe dargestellt. Neben dem Induktionsfaktor ist mit einem ± der SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden in fetten Zahlen eingetragen. Signifikante Hochregulierungen wurden rot unterlegt, Abregulation grün.

G Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock den, 12.05.2015

Andreas Brietzke